

Aus dem Zentrum für klinische Tiermedizin  
und  
dem Veterinärwissenschaftlichen Department  
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von

Univ.-Prof. Dr. Müller

und

Univ.-Prof. Dr. Ph.D. Straubinger

# **Lokalisation und Typisierung multiresistenter Staphylokokken bei Hunden mit Pyodermie und ihren Besitzern**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde der  
Tierärztlichen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Claudia Horstmann

aus Minden

München 2012

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan

Univ.-Prof. Dr. Braun

Berichterstatter

Univ.-Prof. Dr. Müller

Korreferent

Univ.-Prof. Dr. Straubinger

Tag der Promotion 11. Februar 2012

Für meine Eltern

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>I.</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>II.</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT .....</b>	<b>3</b>
<b>1.</b>	<b>Aufbau der Haut des Hundes.....</b>	<b>3</b>
1.1.	Anatomie und Physiologie der Haut sowie Mechanismen der Infektionsabwehr .....	3
1.2.	Kutane Mikroflora.....	4
<b>2.</b>	<b>Die Pyodermie des Hundes .....</b>	<b>5</b>
2.1.	Ätiologie der Pyodermie des Hundes.....	5
2.2.	Klassifizierung und klinisches Bild der Pyodermie des Hundes.....	6
2.3.	Pathogenese .....	7
2.4.	Diagnose und Differentialdiagnosen .....	8
2.4.1.	Zytologie .....	8
2.4.2.	Bakteriologische Untersuchung und Empfindlichkeitsbestimmung .....	9
2.5.	Therapie.....	9
2.5.1.	Therapie der Ursache .....	9
2.5.2.	Therapie der bakteriellen Infektion .....	9
2.5.2.1.	Lokale antimikrobielle Therapie .....	9
2.5.2.2.	Systemische antimikrobielle Therapie .....	10
<b>3.</b>	<b>Relevante Staphylokokken bei Hund und Mensch .....</b>	<b>13</b>
3.1.	Taxonomie und Gattungsmerkmale .....	13
3.2.	Pathogenitätsfaktoren der Staphylokokken.....	14
3.3.	<i>S. pseudintermedius</i> .....	15
3.3.1.	Methicillin-resistente <i>S. pseudintermedius</i> .....	16
3.3.2.	Bedeutung für Hund und Mensch .....	16
3.4.	<i>S. aureus</i> .....	17
3.4.1.	Methicillin-resistente <i>S. aureus</i> und deren Bedeutung für Hund und Mensch .....	18
3.5.	Koagulase-negative Staphylokokken .....	19
3.5.1.	Methicillin-resistente <i>Staphylococcus haemolyticus</i> .....	19
3.5.2.	Methicillin-resistente <i>S. epidermidis</i> .....	19

<b>4.</b>	<b>Charakterisierung von Staphylokokken .....</b>	<b>20</b>
4.1.	Identifizierung von Staphylokokken .....	20
4.1.1.	Identifizierung von Staphylokokken mittels MALDI-TOF MS .....	20
4.1.2.	16S-rRNA-Sequenzierung von Staphylokokken .....	20
4.1.3.	Identifizierung von <i>S. pseudintermedius</i> mittels <i>pta</i> -PCR-RFLP .....	21
4.2.	Phänotypische Empfindlichkeitsbestimmung .....	21
4.2.1.	Agardiffusionstest .....	22
4.2.2.	Bouillon-Mikrodilution .....	22
4.2.3.	Selektivmedien für das Screening auf Methicillin-resistente Staphylokokken .....	23
4.3.	Typisierungsverfahren für Staphylokokken .....	23
4.3.1.	Pulsfeld-Gelelektrophorese .....	23
4.3.2.	Typisierung des <i>spa</i> -Gens .....	24
4.3.3.	SCC <i>mec</i> -Typisierung .....	25
4.3.4.	Multilocus-Sequenz-Typisierung .....	25
4.3.5.	Microarray-basierte Genotypisierungen .....	25
<b>5.</b>	<b>Resistenzen bei Staphylokokken .....</b>	<b>26</b>
5.1.	Allgemeine Resistenzproblematik .....	26
5.2.	Mobile genetische Element (SCC <i>mec</i> ) .....	27
5.3.	Ausgewählte Resistenzgene der Staphylokokken .....	30
5.3.1.	Resistenzen gegen $\beta$ -Laktam-Antibiotika .....	30
5.3.1.1.	<i>mecA</i> .....	30
5.3.1.2.	<i>blaZ</i> .....	30
5.3.2.	Resistenzen gegen Aminoglykoside .....	30
5.3.2.1.	<i>aphA-3</i> .....	30
5.3.2.2.	<i>aadD</i> .....	31
5.3.2.3.	<i>aac-aphD</i> .....	31
5.3.3.	Resistenzen gegen Makrolide und Lincosamide .....	31
5.3.3.1.	<i>erm(A)</i> , <i>erm(B)</i> und <i>erm(C)</i> .....	31
5.3.3.2.	<i>linA</i> .....	32
5.3.3.3.	<i>mpbBM</i> und <i>msrA</i> .....	32
5.3.4.	Resistenzen gegen Tetracykline .....	32
5.3.4.1.	<i>tet(K)</i> .....	32
5.3.4.2.	<i>tet(M)</i> .....	32

5.3.5.	Resistenzen gegen Fluorchinolone.....	33
5.3.6.	Resistenzen gegen Chloramphenicol .....	33
5.3.7.	Resistenzen gegen Mupirocin .....	34
5.3.8.	Resistenzen gegen Fusidinsäure.....	34
5.3.9.	Unspezifische Effluxpumpen .....	35
5.3.9.1.	<i>qacA</i> .....	35
<b>III.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>36</b>
<b>1.</b>	<b>Material .....</b>	<b>36</b>
1.1.	Patientengut .....	36
1.2.	Bakterienstämme (Kontrollstämme) .....	36
1.2.1.	Medien, Lösungen und Puffer .....	37
1.2.2.	Selektivmedien .....	37
1.2.3.	Primer .....	38
1.2.4.	Chemikalien und Enzyme .....	38
1.2.5.	Geräte und sonstige Materialien.....	38
<b>2.</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>39</b>
2.1.	Vorstudie Selektivmedien .....	39
2.1.1.	Anzucht .....	39
2.1.2.	Mischungsversuche .....	40
2.1.3.	Semiquantitativer Bakteriennachweis .....	40
2.2.	Hauptstudie.....	41
2.2.1.	Probennahme .....	41
2.2.2.	Patientendaten .....	41
2.2.3.	Anzucht, Subkultivierung, Asservierung .....	41
2.2.4.	Speziesidentifizierung .....	42
2.2.4.1.	ORSAB.....	42
2.2.4.2.	MALDI-TOF MS .....	42
2.2.4.3.	<i>pta</i> -PCR mit anschließender Restriktionsanalyse .....	43
2.2.5.	Empfindlichkeitsbestimmung der Bakterienstämme .....	43
2.2.5.1.	Agardiffusion .....	43
2.2.5.1.1.	Bestimmung der Minimalen Hemmkonzentration .....	44
2.2.6.	Molekularbiologische Untersuchungen.....	45
2.2.6.1.	Gesamtzell-DNA-Isolierung .....	45
2.2.6.1.1.	Phenol-Chloroform-Extraktion nach Jordens & Hall (1988).....	45

---

2.2.6.1.2.	DNA-Isolierung mittels DNeasy Blood&Tissue Kit .....	46
2.2.6.2.	Polymerase-Kettenreaktion .....	47
2.2.6.3.	Lineare Multiplex-PCR .....	49
2.2.6.4.	Aufreinigung und Quantifizierung von PCR-Amplifikaten .....	50
2.2.6.5.	Restriktionsanalysen .....	51
2.2.6.5.1.	Restriktionsanalyse mit <i>Mbo</i> I .....	51
2.2.6.5.2.	Makrorestriktion mit anschließender Pulsfeld-Gelelektrophorese .....	52
2.2.6.6.	Agarose-Gelelektrophorese .....	54
2.2.6.7.	Microarray .....	55
2.2.6.8.	Sequenzierungen .....	59
<b>IV.</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>60</b>
<b>1.</b>	<b>Vorstudie Selektivmedien .....</b>	<b>60</b>
1.1.	Ergebnisse der untersuchten Selektivmedien .....	60
1.2.	Ergebnisse der Mischungsversuche .....	61
1.3.	Ergebnisse des quantitativen Bakteriennachweises .....	61
<b>2.</b>	<b>Hauptstudie .....</b>	<b>64</b>
2.1.	Probensammlung sowie Auswertung der Hunde- und Besitzerdaten .....	64
2.1.1.	Speziesidentifizierungen .....	67
2.1.1.1.	MRSP bei Hunden und Besitzern .....	67
2.1.1.2.	MRSH bei Hunden und Besitzern .....	69
2.1.1.3.	mRSP bei Hunden und Besitzern .....	71
2.1.1.4.	MRSA bei Hund und Besitzer .....	73
2.1.2.	Phänotypische Empfindlichkeitsbestimmungen .....	73
2.1.2.1.	Empfindlichkeitsbestimmung der MRSP-Stämme .....	73
2.1.2.2.	Empfindlichkeitsbestimmung der MRSH-Stämme .....	73
2.1.2.3.	Empfindlichkeitsbestimmung der mRSP-Stämme .....	74
2.1.2.4.	Empfindlichkeitsbestimmung der MRSA-Stämme .....	74
2.1.3.	Molekularbiologische Charakterisierungen .....	77
2.1.3.1.	<i>spa</i> -Typisierungen .....	77
2.1.3.1.1.	<i>spa</i> -Typisierungen der MRSP-Stämme .....	77
2.1.3.1.2.	<i>spa</i> -Typisierungen des MRSA-Stämme .....	78
2.1.3.2.	Makrorestriktionsanalyse .....	79
2.1.3.2.1.	Makrorestriktionsanalyse der MRSP-Stämme .....	79
2.1.3.2.2.	Makrorestriktionsanalyse der MRSH-Stämme .....	81

2.1.3.3.	Microarray-basierte Genotypisierungen.....	81
2.1.3.3.1.	Genotypisierung der MRSP-Stämme.....	81
2.1.3.3.2.	Genotypisierung der MRSH-Stämme .....	82
2.1.3.3.3.	Genotypisierung der mRSP-Stämme .....	82
2.1.3.3.4.	Genotypisierung des MRSA-Stämme .....	83
<b>V.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>88</b>
<b>1.</b>	<b>Vorstudie: Beurteilung von Selektivmedien zum Nachweis von MRSP .....</b>	<b>88</b>
<b>2.</b>	<b>Hauptstudie: Screening hinsichtlich Methicillin-resistenter Staphylokokken .....</b>	<b>90</b>
2.1.	Speziesidentifizierungen .....	90
2.2.	Resistenzprofile .....	91
2.3.	Genotypisierungen .....	92
<b>VI.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>97</b>
<b>VII.</b>	<b>SUMMARY.....</b>	<b>100</b>
<b>VIII.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>103</b>
<b>IX.</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>130</b>
<b>1.</b>	<b>Medien, Lösungen und Puffer.....</b>	<b>130</b>
<b>2.</b>	<b>Chemikalien und Enzyme.....</b>	<b>135</b>
<b>3.</b>	<b>Geräte und sonstige Materialien.....</b>	<b>137</b>
<b>4.</b>	<b>Einverständniserklärung und Fragebögen .....</b>	<b>138</b>
4.1.	Einverständniserklärung.....	138
4.2.	Besitzer-Fragebogen.....	139
4.3.	Tierprotokoll.....	140
<b>5.</b>	<b>Phänotypische Empfindlichkeitsbestimmung .....</b>	<b>141</b>
5.1.	Tabelle IX-2 Phänotypische Empfindlichkeit der MRSP-Stämme.....	141
5.2.	Tabelle IX-3: Phänotypische Empfindlichkeit der MRSH-Stämme .....	142
5.3.	Tabelle IX-4: Phänotypische Empfindlichkeit der mRSP-Stämme .....	142
5.4.	Tabelle IX-5: Phänotypische Empfindlichkeit der MRSA-Stämme .....	143
<b>6.</b>	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>144</b>



---

<b>7.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>145</b>
<b>X.</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>146</b>

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

Abb	Abbildung
AK	Amikacin
AMP	Ampicillin
ATCC	American Type Culture Collection
AUG	Amoxicillin-Clavulansäure
bp	Basenpaare
BfT	Bundesverband für Tiergesundheit
BAP	Blutagarplatten
BHI	Brain-Heart-Infusion
Brilliance	Brilliance MRSA agar
C	Chloramphenicol
CAMHB	Kationen-adjustierte-Mueller-Hinton Bouillon
CAT	Chloramphenicol-Acetyltransferasen
CF	Cefalexin
chromID	chromID <sup>TM</sup> MRSA agar
CHROMagar	BD BBL <sup>TM</sup> CHROMagar <sup>TM</sup> MRSA
CL	Cefalothin
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CN	Gentamicin
CPD	Cefpodoxim
CVN	Cefovecin
DA	Clindamycin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DO	Doxycyclin
DSM	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen
E	Erythromycin
<i>E.</i>	<i>Escherichia coli</i>
EF-G	Elongationsfaktor G
ENR	Enrofloxacin
g	Erdbeschleunigung
h	Stunde
HRP	Horseradish (Meerrettich)-Peroxidase
IPM	Imipenem
IS	Insertionssequenzen
kb	Kilobase
KBE	Kolonie-bildende Einheiten
<i>K.</i>	<i>Klebsiella</i>
KNS	Koagulase-negative Staphylokokken
MALDI-TOF	Matrix assisted laser desorption ionization-time of flight
MAR	Marbofloxacin
min	Minute
mRSP	Multiresistente <i>S. pseudintermedius</i> (ohne Methicillinresistenz)
MSe	Methicillin-sensibel
MSA	Mannitol Salt Agar mit Oxacillin
MFS	Major facilitator Superfamily
MHK	Minimale Hemmkonzentration
MLST	Multilocus-Sequenz-Typisierung
mm	millimeter
MRSA	Methicillin-resistente <i>S. aureus</i>

---

MRSH	Methicillin-resistente <i>S. haemolyticus</i>
MRSI	Methicillin-resistente <i>S. intermedius</i>
MRSP	Methicillin-resistente <i>S. pseudintermedius</i>
MS	Massenspektrometrie
MSSP	Methicillin-sensible <i>S. pseudintermedius</i>
MUP	Mupirocin
NCTC	National Collection of Type Cultures
o.B.	ohne Befund
orfX	Open reading frame Gen X
ORSAB	Oxacillin Resistance Screening Agar Base
OX	Oxacillin
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFGE	Pulsfeld-Gelelektrophorese
<i>Pr.</i>	<i>Proteus</i>
<i>Ps.</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
RFLP	Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus
rpm	Rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
<i>S.</i>	<i>Staphylococcus</i>
sec	Sekunden
SCC <sub>mec</sub>	Staphylokokken-Chromosomen-Kassette <i>mec</i>
SDS	Natrium-dodecylsulfat
SIG	<i>S. intermedius</i> -Gruppe
SIS	Skin Immune System
SXT	Trimethoprim-Sulfonamide
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TES	Tris-EDTA-Natriumchlorid
µl	Mikroliter
V	Vancomycin

## I. EINLEITUNG

Die Pyodermie als eine bakterielle Hautinfektion ist eine der häufigsten Vorstellungsgründe von Hunden in der tierärztlichen Praxis bzw. Klinik. Dies ist unter anderem anatomischen und physiologischen Gegebenheiten wie dem relativ hohen pH-Wert der Hundehaut geschuldet (IHRKE, 1996; OFEK et al., 2003). Meist liegen Hautinfektionen mit Staphylokokken vor, wobei primär Parasiten, Allergien, anatomische Gegebenheiten, hormonelle Erkrankungen oder Autoimmunerkrankungen für die Hautinfektion verantwortlich sind (STEWART, 1988; HILL & MORIELLO, 1994).

Im Gegensatz zu den Hautinfektionen des Menschen, bei denen meist *Staphylococcus aureus* nachgewiesen wird, ist bei Hunden *Staphylococcus pseudintermedius* der häufigste Erreger der Pyodermie (FITZGERALD, 2009). Die Haupttherapie für die Behandlung einer bakteriellen Hautinfektion ist die orale Gabe eines geeigneten Antibiotikums. Dabei sind sowohl die Wahl der Antibiotikaklasse, die Dosierung als auch das Behandlungsintervall wichtig für den Erfolg der Antibiotikatherapie (DOWLING, 1996). Ohne die Therapie der zugrundeliegenden Ursache kann die Antibiotikatherapie jedoch keinen oder nur einen kurzzeitigen Erfolg erzielen (LLOYD, 1996; MUELLER, 2008).

Behandlungen können durch das Vorkommen von multiresistenten Bakterien erschwert werden. Multiresistenz wird als eine Resistenz gegen mehr als drei Antibiotikaklassen definiert (SCHWARZ et al., 2010). Methicillin-resistente Staphylokokken besitzen ein *mecA*-Gen, welches für ein zusätzliches Penicillin-bindendes-Protein mit einer niedrigen Affinität für  $\beta$ -Laktam-Antibiotika kodiert. Meist besitzen Methicillin-resistente Staphylokokken weitere Resistenzgene, so dass nicht nur eine Resistenz gegen  $\beta$ -Laktam-Antibiotika, sondern auch gegen viele verschiedene andere Antibiotikaklassen vorliegt (DEURENBERG & STOBBERINGH, 2008). Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) werden in der Humanmedizin in “hospital-associated”- (HA-MRSA), “community-associated”- (CA-MRSA) und “livestock-associated”-MRSA (LA-MRSA) eingeteilt. Die bakteriologische Untersuchung von Hauttupfern mit Erstellung eines Antibiotika-Resistenzprofils ist, insbesondere bei rezidivierenden oder nicht auf Antibiotika ansprechenden Pyodermien für die Wahl eines

geeigneten Antibiotikums entscheidend (ROSSER, 2006). Sowohl in der Tier- als auch in der Humanmedizin konnte in den letzten Jahren eine Zunahme an Infektionen mit multiresistenten Staphylokokken beobachtet werden (LLOYD, 2007). Wichtig ist hierbei auch das zoonotische Potential dieser Erreger, da vor allem die Besitzer und das tiermedizinische Personal engen Kontakt zu erkrankten Hunden haben. Zudem besteht die Möglichkeit, dass multiresistente Staphylokokken vom Besitzer oder tiermedizinischen Personal auf den Hund übertragen werden (HANSELMAN et al., 2009; NIENHOFF et al., 2009; PAUL et al., 2011).

Die Studie soll zum Verständnis des Vorkommens und der Übertragbarkeit multiresistenter Staphylokokken bei Hunden bzw. zwischen Hunden und Besitzern beitragen. Mögliche Übertragungswege sollen aufgezeigt werden, um eine adäquate Besitzerinformation zu ermöglichen und das Risiko einer Übertragung zwischen Mensch und Hund besser einschätzen zu können. Außerdem gibt diese Studie einen Überblick über das lokale Resistenzprofil von Staphylokokken bei Hunden mit rezidivierenden oder nicht auf Antibiotika ansprechenden Pyodermien.

## II. LITERATURÜBERSICHT

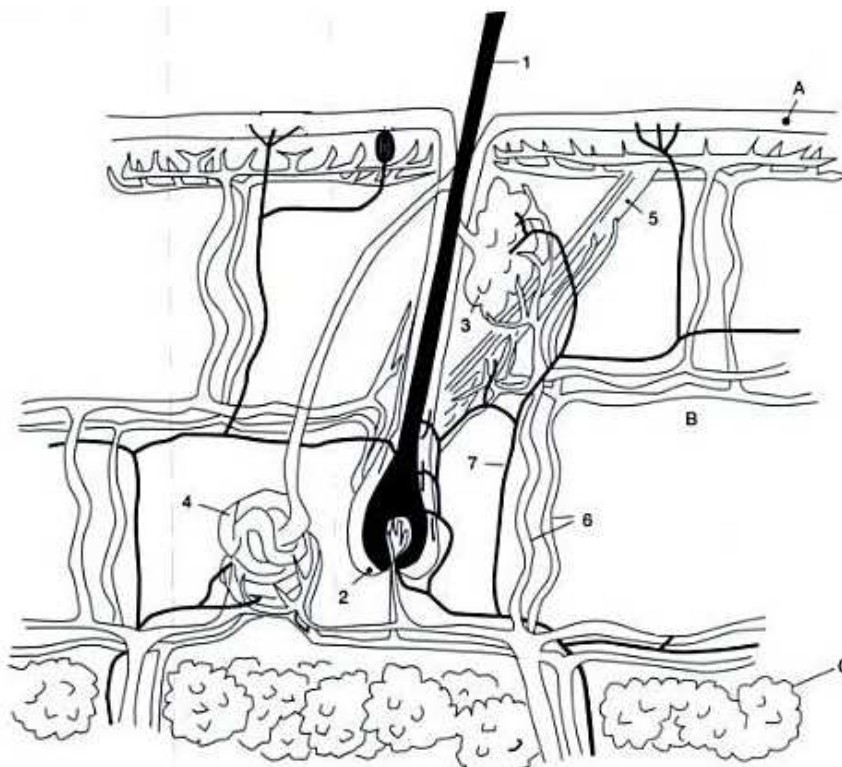
### 1. Aufbau der Haut des Hundes

#### 1.1. Anatomie und Physiologie der Haut sowie Mechanismen der Infektionsabwehr

Die Haut setzt sich aus Epidermis, Dermis, Subkutis und den Hautanhangsorganen zusammen (s. Abbildung [Abb.] II-1). Die Epidermis besteht aus mehrschichtigen Lagen von Epithelzellen, den sogenannten Keratinozyten. Diese sind in der Basalmembran verankert, welche zwischen Epidermis und Dermis liegt. Der Aufbau der Epidermis beruht auf der Entwicklung und Differenzierung der Keratinozyten. Die verschiedenen Schichten der Epidermis werden als *Stratum basale*, *Stratum spinosum*, *Stratum granulosum* und *Stratum corneum* (mit den kernlosen Korneozyten) bezeichnet (LLOYD & GARTHWAITE, 1982; SERRA et al., 2007; MUELLER, 2008). Hauptbaustoff der Korneozyten ist das Keratin. Dieser Keratinschutzmantel ist wasserfest und für die meisten Mikroorganismen nicht durchdringbar. Die Basalmembran ist eine weitere Barriere, um das Vordringen von Mikroorganismen in die Dermis zu verhindern (FINE, 1991). Die Dermis enthält kollagene und elastische Fasern, welche von Fibrozyten produziert werden sowie eine mukopolysaccharide Grundsubstanz (SCHWARZ et al., 1979). Die Hauptfunktion der Dermis ist die Gewährleistung der Elastizität der Haut. In die Dermis sind Talg- und Schweißdrüsen eingebettet (s. Abb. II-1). Talgdrüsen produzieren Sebum, ein fettiges Sekret, welches das Fell geschmeidig hält und den oberen Schutzfilm der Haut bildet. Die Schweißdrüsen beim Hund produzieren ein wässriges Sekret, in welchem spezifische (z.B. Immunoglobuline) und unspezifische (z.B. Transferrin) Abwehrfaktoren enthalten sind. Dieses wässrige Sekret und das Sebum bilden den hydrolipiden Film der Hautoberfläche (NOLI & SCARAMPELLA, 2005).

Das Haar als eine weitere Schutzbarriere liegt in einer Einstülpung der Epidermis in die Dermis, dem Haarfollikel (s. Abb. II-1). Der oberste Teil des Haarfollikels ist der Haarbalgtrichter (*Infundibulum*). Im unteren Bereich der Dermis entsteht das Haar an der Haarwurzel (SPERLING, 1991).

Das sogenannte „Skin Immune System“ (SIS) ist ein Hauptbestandteil der Infektionsabwehr der Haut. Es besteht aus Langerhanszellen, Lymphozyten, Mastzellen und Endothelzellen. Die Langerhanszellen sind als dendritische Zellen in die Epidermis eingelagert, fangen dort Fremdmoleküle ab, präsentieren sie den Lymphozyten und lösen damit eine spezifische Immunantwort aus. Die Lymphozyten sind in Epidermis und Dermis lokalisiert. Ein Großteil der Lymphozyten sind Gedächtniszellen, welche eine rasche Immunantwort ermöglichen. Durch Degranulation der Mastzellen, welche gefäßnah in der Dermis liegen, werden Entzündungsmediatoren freigesetzt, welche zur Vasodilation, Ödembildung und zellulären Diapedese der zirkulierenden Lymphozyten beitragen. Außerdem helfen Endothelzellen bei der Migration zirkulierender Lymphozyten (SCOTT et al., 2001; NOLI & SCARAMPELLA, 2005).



**Abbildung II-1:** Aufbau der Haut aus NOLI & SCARAMPELLA, 2005

A: Epidermis; B: Dermis; C: Subcutis; 1: Haar; 2: Haarwurzel; 3: Talgdrüse; 4: apokrine Schweißdrüse; 5: Haarbalgmuskel; 6: Blutgefäße; 7: Nerven

## 1.2. Kutane Mikroflora

Die kutane Mikroflora gehört neben physikalischen und chemischen Barrieren zu den Schutzbarrieren der Haut (HILL & MORIELLO, 1994). Die Bakterien und

Hefen befinden sich sowohl auf der Epidermis als auch im Infundibulum der Haarfollikel und leben in Symbiose zum Wirt (SAIJONMAA-KOULUMIES & LLOYD, 1996). Sie verhindern eine zu starke Vermehrung von potentiell pathogenen Mikroorganismen. Die Bakterienmenge variiert unter den Individuen und an den verschiedenen Körperstellen. Insbesondere das Kinn, der Zwischenzehen-Bereich, das Ohr und das Abdomen weisen aufgrund der dort herrschenden Feuchtigkeit und Wärme optimale Wachstumsbedingungen für Bakterien auf (KROGH & KRISTENSEN, 1976).

Man unterscheidet eine residente und eine transiente Mikroflora, wobei residente Bakterien langfristig auf der Haut verbleiben (SAIJONMAA-KOULUMIES & LLOYD, 1996). Die transiente Mikroflora kann pathogen oder nicht pathogen sein. Teilweise werden zusätzlich sogenannte Nomaden erwähnt, bei denen eine Zuordnung zur transienten oder zur residenten Mikroflora nicht möglich war (SOMERVILLE-MILLAR & NOBLE, 1974).

Zu den residenten Bakterien gehören u.a. *Micrococcus* spp., koagulase-negative Staphylokokken (KNS), Streptokokken, *Clostridium* spp., *Acinetobacter* spp. und verschiedene gramnegative Aerobier. Transiente pathogene Bakterien besiedeln vorübergehend die Haut und spielen als Erreger bzw. Sekundärerreger von Hautinfektionen eine Rolle. Hierzu gehören u.a. *Staphylococcus* (*S.*) *aureus*, *Escherichia* (*E.*) *coli*, *Proteus* (*Pr.*) *mirabilis*, *Corynebacterium* spp. und *Pseudomonas* spp. (STEWART, 1988; HARVEY & LLOYD, 1995; STRANGE et al., 1996).

Umstritten ist die Einordnung für *Staphylococcus* (*S.*) *pseudintermedius* (früher *S. intermedius*, s. 3.2) (HARVEY & NOBLE, 1994; MASON et al., 1996). Eine residente Besiedlung der Schleimhäute von oberem Respirationstrakt, Maulhöhle und Anus ist nachgewiesen, hingegen wird von einer transienten Kolonisierung der Haut ausgegangen. Es wird vermutet, dass die Staphylokokken durch Belecken auf die Haut übertragen werden (LLOYD, 1996).

## **2. Die Pyodermie des Hundes**

### **2.1. Ätiologie der Pyodermie des Hundes**

Hautinfektionen des Hundes sind meist sekundär bedingt. Daher sollte eine Abklärung und Behandlung der zugrundeliegenden Ursache (Ektoparasiten,



Allergien, anatomische Gegebenheiten, hormonelle Erkrankungen, Autoimmunerkrankungen), welche optimale Wachstumsbedingungen für die bakterielle Population schafft, erfolgen (STEWART, 1988; HILL & MORIELLO, 1994).

Die bakterielle Hautinfektion des Hundes wird als Pyodermie bezeichnet. Der Haupterreger der Pyodermie des Hundes ist *S. pseudintermedius* (FITZGERALD, 2009). Gelegentlich kann auch *S. aureus* als Ursache der Pyodermie festgestellt werden (LLOYD, 1996). Seltener sind KNS, wie *S. epidermidis* und *S. xylosus* als Sekundärerreger an einer Hautinfektion beteiligt (MEDLEAU et al., 1986). Bisher wurde *S. haemolyticus* nicht als Erreger der Pyodermie des Hundes nachgewiesen, jedoch ist eine Beteiligung an Hautinfektionen beim Menschen bekannt (SHITTU et al., 2004). Gramnegative Bakterien wie *Pseudomonas* spp., *Pr. mirabilis* und *E. coli* können als Sekundärerreger eine Rolle spielen (HILL & MORIELLO, 1994). Außerdem sind Hefen, wie *Malassezia pachydermatis*, und Dermatophyten bei Hautinfektionen des Hundes von Bedeutung. In sehr seltenen Fällen kann bei tiefen Pyodermien auch eine Infektion mit Mykobakterien oder Aktinomyzeten vorliegen (LLOYD, 1996).

## **2.2. Klassifizierung und klinisches Bild der Pyodermie des Hundes**

Als Kriterium zur Klassifizierung der Pyodermie wird meist die Tiefe der Infektion herangezogen, da diese Einteilung aus diagnostischen und therapeutischen Gründen am sinnvollsten ist (STEWART, 1988). Generell unterscheidet man die Oberflächenpyodermie, die oberflächliche Pyodermie und die tiefe Pyodermie (HILL & MORIELLO, 1994; LLOYD, 1996). Bei der Oberflächenpyodermie sind nur die obersten Zellschichten der Epidermis betroffen. Hierzu gehören beispielsweise die pyotraumatische Dermatitis und Intertrigo. Die pyotraumatische Dermatitis, auch als Hot Spot bezeichnet, wird häufig durch eine Flohbissallergie ausgelöst. Klinisch sichtbar sind lokalisierte Hautareale mit erosiven Hautveränderungen, feuchtem Haar und Exsudatbildung (HOLM et al., 2004). Beim Intertrigo handelt es sich um eine Hautfaltenpyodermie, welche durch Irritation, Feuchtigkeit und mangelnde Ventilation in den Hautfalten des Gesichtes von zum Beispiel (z.B.) Bulldoggen oder Möpsen sowie den Falten um die Vulva oder am Abdomen bei übergewichtigen Hunden entsteht (LLOYD, 1996).

Die oberflächliche Pyodermie betrifft alle Zellschichten der Epidermis. Als Beispiel können Impetigo und die oberflächliche Follikulitis genannt werden. Impetigo ist eine Erkrankung des Junghundes, die mit Pustelbildung in der Epidermis einhergeht. Die Pustelbildung ist im Gegensatz zur oberflächlichen Follikulitis nicht Haarfollikel-assoziiert (STEWART, 1988). Die oberflächliche Follikulitis ist eine der häufigsten Pyodermieformen (HILL & MORIELLO, 1994). Das typische Bild von follikulären entzündeten Pusteln ist nur vorübergehend zu beobachten. Häufig anzutreffende Läsionen sind Papeln, Krusten, epidermale Kollaretten, Schuppenkränze, Hyperpigmentierung und Alopezie (HILL & MORIELLO, 1994). Ursächlich sind hierbei oft Krankheiten wie Demodikose (parasitäre Hauterkrankung mit Haarbalgmilben), Allergien oder Hypothyreose.

Die tiefe Pyodermie des Hundes ist wesentlich seltener. Hierbei ist die Basalmembran zwischen Epidermis und Dermis nicht mehr intakt, so dass Infektionen bis in die Dermis und Subkutis reichen können. Die Einteilung innerhalb dieser Gruppe erfolgt nach der jeweils betroffenen Struktur (z.B. Cellulitis) und nach der Lokalisation der Infektion (lokalisiert oder generalisiert). Klinisch auffällig sind tiefe noduläre Pusteln mit zentralen Ulzerationen, Krustenbildung und hämorrhagischen Blasen, sowie teilweise auch nekrotischem Gewebe (SCOTT et al., 2001).

Ein relativ unspezifisches Symptom bei Hauterkrankungen ist der Juckreiz. Verantwortlich können die Primärerkrankung oder die bakterielle Hautinfektion sein. Meist tragen sowohl Primärerkrankung als auch Pyodermie zum Entstehen des Juckreizes bei (STEWART, 1988).

### **2.3. Pathogenese**

Die Entstehung einer Pyodermie wird maßgeblich von der zugrundeliegenden Ursache beeinflusst (s. 2.1.). Dabei ist die Adhäsion von Staphylokokken an kanine Korneozyten ein Initialschritt für die Entwicklung einer Hautinfektion (ALY et al., 1993; OFEK et al., 2003). Bei Hunden mit Umweltallergie konnte im Gegensatz zu gesunden Hunden eine signifikant höhere Adhäsion von *S. pseudintermedius* an die Korneozyten festgestellt werden (MCEWAN & KALNA, 2005; SIMOU et al., 2005). Außerdem ist die Adhäsion von *S. pseudintermedius* an kanine Korneozyten signifikant stärker als an humane

Korneozyten (SIMOU et al., 2005a). Weiterhin beeinflussen die Pathogenitäts- und Virulenzfaktoren der Staphylokokken maßgeblich deren Vermehrung und Penetration in die Haut (siehe Pathogenitätsfaktoren). Die Immunitätslage des Hundes hat ebenso Einfluss auf die Entstehung einer Pyodermie, jedoch sind weitere Studien nötig, um die Interaktionen zwischen Immunsystem und auslösendem Pathogen genauer verstehen zu können (FOSTER, 2004). Hunde erkranken wesentlich häufiger an Hautinfektionen als jede andere Säugetierspezies. Die möglichen Ursachen hierfür sind noch nicht abschließend geklärt. Man vermutet, dass das dünne *Stratum corneum*, die geringe Menge an interzellulären Lipiden und der relativ hohe pH-Wert die Entstehung einer Pyodermie begünstigen (MASON & LLOYD, 1993; IHRKE, 1996).

#### **2.4. Diagnose und Differentialdiagnosen**

Die Verdachtsdiagnose Pyodermie kann zunächst anhand der klinisch sichtbaren Läsionen gestellt werden. Es sind jedoch weitere diagnostische Methoden nötig, um die Diagnose Pyodermie zu bestätigen bzw. um Differentialdiagnosen auszuschließen. Eine klinisch manifeste Demodikose sollte mit einem Hautgeschabsel ausgeschlossen werden (HILL & MORIELLO, 1994). Ebenso ist bei entsprechender Anamnese und Zytologie das Anlegen einer Pilzkultur zum Ausschluss einer Dermatophyteninfektion ratsam. Die zytologische und bakteriologische Untersuchung können die Verdachtsdiagnose Pyodermie bestätigen. Bei weiterhin unklarer Diagnose können weitere diagnostische Methoden wie die Entnahme von Hautbiopsien sinnvoll sein (SCOTT et al., 2001).

Differentialdiagnostisch sind die zugrunde liegenden Ursachen zu beachten, da eine bakterielle Infektion meist sekundär bedingt ist (s. 2.1.). Malasseziendermatitis, Demodikose, Neoplasien oder Verbrennungen können mit ähnlichen klinischen Läsionen wie eine bakterielle Hautinfektion einhergehen.

##### **2.4.1. Zytologie**

Die Diagnose Pyodermie kann über den zytologischen Nachweis von neutrophilen Granulozyten mit intrazellulären Bakterien erfolgen. Extrazelluläre Bakterien sind nicht beweisend für eine Pyodermie, können aber bei massenhaftem Vorkommen auf eine Pyodermie hindeuten (STEWART, 1988). Die Bakterien können anhand ihrer Form in Kokken und Stäbchen unterteilt werden. Über eine Gram-Färbung

ist auch eine Differenzierung in grampositive und gramnegative Bakterien möglich. Meist wird jedoch in der Praxis die etwas weniger zeitaufwändige modifizierte Wright-Giemsa (Diff Quick)-Färbung durchgeführt (MENDELSON et al., 2006). Eine sichere Speziesidentifizierung ist über weitere bakteriologische Untersuchungen möglich (s. 2.4.2.).

#### **2.4.2. Bakteriologische Untersuchung und Empfindlichkeitsbestimmung**

Die Anzucht von Bakterien ist vor allem im Hinblick auf eine sichere Speziesidentifizierung und anschließende Empfindlichkeitsbestimmung sinnvoll. Anhand des erstellten Resistenzprofils kann ein geeignetes Antibiotikum für die Therapie der Pyodermie ausgewählt werden (ROSSER, 2006). Bei zytologischem Nachweis von Stäbchen sollte immer eine bakteriologische Untersuchung mit Resistenzbestimmung eingeleitet werden, da diese Bakterien sehr häufig Resistenzen gegen verschiedene Antibiotikaklassen aufweisen und eine Therapie deutlich erschwert sein kann. Weitergehende bakteriologische Untersuchungen sind bei rezidivierender oder nicht auf Antibiotika ansprechender Pyodermie auch dann empfehlenswert, wenn zytologisch Kokken nachgewiesen wurden (HILL & MORIELLO, 1994).

### **2.5. Therapie**

#### **2.5.1. Therapie der Ursache**

Für einen langfristigen Behandlungserfolg des Patienten ist eine Therapie der primären Ursache (s. 2.1.) der Pyodermie entscheidend. Eine antimikrobielle Therapie kann nur vorübergehend erfolgreich sein (LLOYD, 1996; MUELLER, 2008). Weitere unterstützende Behandlungen wie die Gabe von Ektoparasitika, Glukokortikoiden oder Antihistaminika richten sich nach der zugrundeliegenden Ursache.

#### **2.5.2. Therapie der bakteriellen Infektion**

##### **2.5.2.1. Lokale antimikrobielle Therapie**

Die lokale antimikrobielle Therapie ist insbesondere bei lokalisierten Hautinfektionen des Hundes sinnvoll (MUELLER, 2008). Antibakterielle Salben können unter anderem Polymyxin, Bacitracin, Silbersulfadiazin, Mupirocin oder Fusidinsäure enthalten. Mupirocin enthält die von *Pseudomonas fluorescens*

gebildete Pseudomoninsäure A, welche die Isoleucyl-tRNA-Synthetase hemmt und so den Einbau von Isoleucin in die Proteine der Staphylokokken verhindert. In der Humanmedizin wird Mupirocin für die Sanierung von Patienten mit multiresistenten Staphylokokken eingesetzt (COIA et al., 2006; FULHAM et al., 2011). Aufgrund des raschen Abbaus durch eine Esterspaltung ist Mupirocin nicht für die systemische Antibiotikatherapie geeignet (SUTHERLAND et al., 1985).

Fusidinsäurehaltige Salben verhindern ebenfalls die ribosomale Proteinbiosynthese durch Bindung an den Elongationsfaktor G (EF-G) (Translokase) und werden häufig für die Behandlung von Oberflächenpyodermien beim Hund genutzt (BURNS et al., 1974). Meist enthalten die Salben zusätzlich ein Kortikosteroid, um den Juckreiz der Hunde zu lindern. Die lokale Therapie einer Oberflächenpyodermie mit Fusidinsäure über sieben Tage hat sich als genauso effektiv herausgestellt wie die siebentägige systemische Behandlung mit Amoxicillin-Clavulansäure (COBB et al., 2005).

Die Shampoo-Therapie ist eine einfache, unterstützende und kostengünstige Methode, um die Bakterienzahl auf der Haut zu reduzieren und die Rezidiv-Rate zu minimieren (DE BOER, 1990). Häufig genutzte antimikrobielle Wirkstoffe in Shampoos sind Benzoyl-Peroxid, Chlorhexidin oder Ethyl-Laktat (MUELLER, 2008).

#### **2.5.2.2. Systemische antimikrobielle Therapie**

Die systemische Antibiotikatherapie bei bakteriellen Hautinfektionen kann nur erfolgreich sein, wenn ein geeignetes Antibiotikum ausgewählt, die korrekte Dosierung und das korrekte Dosierungsintervall eingehalten werden sowie die zugrundeliegende Ursache der Pyodermie behandelt wird (DOWLING, 1996). Je nach Immunitätslage des Patienten sollte ein bakterizides oder bakteriostatisches Antibiotikum ausgewählt werden. Es wird außerdem zwischen konzentrationsabhängigen und zeitabhängigen Antibiotika unterschieden. Konzentrationsabhängige Antibiotika werden meist in hohen Konzentrationen und längeren Intervallen verabreicht, da hohe Serum-Spitzen-Konzentrationen erreicht werden müssen, um den maximalen antimikrobiellen Effekt zu erzielen. Hingegen werden zeitabhängige Antibiotika in kürzeren Intervallen verabreicht, um die minimale Hemmkonzentration (MHK) möglichst lange zu überschreiten. Weiterhin sind die Nebenwirkungen des jeweiligen Antibiotikums und die

Wechselwirkungen mit anderen Medikamenten zu beachten.

Die Behandlungsdauer ist von der Tiefe der Hautinfektion abhängig. Bei oberflächlichen Pyodermien wird eine Behandlung über sieben Tage nach der klinischen Heilung empfohlen. Bei tiefen Pyodermien sollte die Therapie sogar über 14 Tage nach Beendigung der klinischen Symptome weitergegeben werden. Einer der häufigeren Gründe für Therapieversagen ist die unzureichende Dauer der Antibiotikatherapie (HILL & MORIELLO, 1994; LLOYD, 1996).

Da *S. pseudintermedius* der Haupterreger der Pyodermie des Hundes ist, wird die zunächst empirisch durchgeführte Therapie auf diesen Erreger abgestimmt (HILL & MORIELLO, 1994). Amoxicillin-Clavulansäure oder Cephalexin sind gut geeignete Antibiotika für die Erstbehandlung einer Pyodermie (DOWLING, 1996).

Amoxicillin gehört zur Gruppe der Aminopenicilline, die in die Zellwandsynthese der Bakterien eingreifen. Aufgrund der nicht selten vorkommenden bakteriellen  $\beta$ -Laktamasen sollte Amoxicillin nur in Kombination mit Clavulansäure als  $\beta$ -Laktamase-Inhibitor eingesetzt werden.  $\beta$ -Laktamasen werden u.a. von Staphylokokken gebildet, hydrolysieren den  $\beta$ -Laktam-Ring und verhindern so die antimikrobielle Wirkung des Antibiotikums. Bei Enzymen, die  $\beta$ -Laktam-Antibiotika inaktivieren, unterscheidet man Penicillinasen, Cephalosporinasen und Carbapenemasen (KROKER et al., 2002).

Cefalexin ist ebenfalls ein  $\beta$ -Laktam-Antibiotikum mit ähnlichem Wirkmechanismus und gehört zur Gruppe der Cephalosporine der ersten Generation. Eine gute Wirksamkeit gegenüber Staphylokokken ist meist gegeben (GANIERE et al., 2005), auch wenn die Resistenzbildung in den letzten Jahren zunimmt (LLOYD, 1996).

Trimethoprim-Sulfonamide können auch für die empirische Behandlung einer Pyodermie eingesetzt werden. Sowohl Trimethoprim als auch die Sulfonamide hemmen die Folsäuresynthese der Bakterien. Gelegentlich weisen *S.-pseudintermedius*-Stämme Resistenzen gegen Trimethoprim-Sulfonamide auf (SCHWARZ et al., 2007).

Makrolide und Lincosamide sind wirksam gegen grampositive Bakterien, indem sie in die bakterielle Proteinbiosynthese eingreifen. Sie können gut die Haut

penetrieren und erreichen hohe intrazelluläre Konzentrationen (NOLI & BOOTHE, 1999). Für *S. pseudintermedius* konnten mittlerweile Resistenzraten von 25-27 % gegen Erythromycin bzw. Clindamycin nachgewiesen werden, so dass die antimikrobielle Therapie einer Staphylokokken-Pyodermie mit diesen Wirkstoffen nur nach Empfindlichkeitsbestimmung sinnvoll ist (SCHWARZ et al., 2007; VANNI et al., 2009).

Tetrazykline hemmen ebenfalls die ribosomale Proteinbiosynthese und sind aufgrund der erhöhten Resistenzlage nicht geeignet für die Therapie einer Pyodermie (RUBIN et al., 2011). Tigecyclin ist als Glycylcyclin ein Derivat der Tetrazykline. Es besitzt eine fünfmal stärkere Affinität zur ribosomalen 30S-Untereinheit als Tetrazykline und umgeht zwei wichtige Resistenzmechanismen (ribosomale Schutzmechanismen und Effluxpumpen; BERGERON et al., 1996). Dieses neu entwickelte Antibiotikum ist auch für die Therapie von multiresistenten Staphylokokken geeignet und ist daher als Reserveantibiotikum der Humanmedizin vorbehalten (CAI et al., 2011).

Bei Versagen einer Antibiotikatherapie mit einem der oben genannten Wirkstoffen, bei rezidivierender oder tiefer Pyodermie sollte in jedem Fall eine bakteriologische Untersuchung eingeleitet werden (s. 2.4.2).

Als weitere Therapieoptionen können Fluorchinolone, Chloramphenicol oder Rifampicin eingesetzt werden (DOWLING, 1996).

Fluorchinolone wie Enrofloxacin, Marbofloxacin oder Pradofloxacin hemmen die Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Gyrase und im Falle von Pradofloxacin gleichzeitig die Topoisomerase IV, welche die räumliche Struktur der Doppelstrang-DNA innerhalb der Bakterien-Zelle modifizieren. Die Gyrase ist für die Spiralisierung der DNA (Supercoiling) verantwortlich, während die Topoisomerase IV die Separation der DNA-Stränge während der Zellteilung bewirkt (DRLICA & ZHAO, 1997; EVERETT & PIDDOCK, 1998; WALKER, 1999). Fluorchinolone besitzen ein sehr breites Wirkspektrum gegenüber grampositiven und gramnegativen Bakterien. Aufgrund des sehr häufigen Gebrauchs von Fluorchinolonen in der Veterinär- und Humanmedizin sind in einigen Ländern wie z.B. Korea Resistenzraten von über 20 % bei kaninen Pyodermien zu beobachten (YOON et al., 2010a). Europäische Studien deuten auf günstigere Resistenzraten bei *S.-pseudintermedius*-Infektionen hin (SCHWARZ



et al., 2007; GOTTLIEB et al., 2008; VANNI et al., 2009).

Chloramphenicol wirkt hemmend auf die Peptidyltransferase-Aktivität (GALE et al., 1981). Eine Nebenwirkung ist das Auftreten einer nicht dosisabhängigen aplastischen Anämie beim Menschen. Daher ist der Einsatz beim Lebensmittel liefernden Tier verboten. Der Einsatz in der Humanmedizin als Reserveantibiotikum erfolgt nur unter strenger Indikationsstellung (KASTEN, 1999).

Rifampicin hemmt die bakterielle DNA-abhängige RNA-Polymerase und wird als Reserveantibiotikum bei der Therapie von multiresistenten Staphylokokken eingesetzt (HERRERA et al., 2003). Aufgrund der schnellen Resistenzentwicklung bei einer Monotherapie mit Rifampicin wird eine Kombination mit anderen Antibiotika wie beispielsweise Tetrazyklinen oder Fusidinsäure empfohlen. Die Studie von KADLEC et al. (2011) konnte nachweisen, dass auch die Kombinationstherapie bei Infektionen mit multiresistenten *S. pseudintermedius* nicht unbedingt einer Resistenzbildung vorbeugt.

### **3. Relevante Staphylokokken bei Hund und Mensch**

#### **3.1. Taxonomie und Gattungsmerkmale**

Staphylokokken gehören zur Familie der *Staphylococcaceae* in der Klasse der *Bacilli*. Charakteristisch für diese Klasse und die Klasse der *Actinobacteria* ist eine Zellwand vom grampositiven Typ mit mehrschichtigem Murein, welche sich durch die Gram-Färbung darstellen lässt (DE VOS et al., 2009). Staphylokokken sind kugelförmige, ca. 1 µm große Bakterien mit niedrigem GC-Gehalt, welche sich sowohl aerob als auch anaerob vermehren können. Sie besitzen eine Katalase, wodurch sie z.B. von Streptokokken unterschieden werden können. Eine weitere Eigenschaft ist ihre Widerstandsfähigkeit gegenüber relativ hohen Salzgehalten und Trockenheit. Staphylokokken sind eine der wichtigsten Erreger von eitrigen Entzündungen (SELBITZ et al., 2011). Eine weitere Aufteilung der Staphylokokken erfolgt aufgrund der Fähigkeit der einzelnen Spezies zur Bildung einer Koagulase. Zu den koagulase-positiven Staphylokokken gehören u.a. *S. aureus* subsp. *aureus* und *S. pseudintermedius*, welche bei Hund und Mensch meist eine höhere Pathogenität als die KNS aufweisen (GRIFFETH et al., 2008).



KNS wie *S. epidermidis* und *S. haemolyticus* sind normale Haut- und Schleimhautbewohner bei Tier und Mensch. Eine krankheitsauslösende Wirkung tritt vor allem bei immunsupprimierten Menschen oder Tieren auf. Die KNS zählen zu den wichtigsten Erregern von nosokomialen Infektionen (PFALLER & HERWALD, 1988; SIDHU et al., 2007).

### **3.2. Pathogenitätsfaktoren der Staphylokokken**

Staphylokokken besitzen diverse Pathogenitätsfaktoren, welche die Adhäsion an Zellen ermöglichen, die Immunabwehr des Wirtes umgehen oder direkt zellschädigende Wirkung haben. Die Pathogenitätsfaktoren von *S. aureus* sind bisher am besten beschrieben worden, jedoch sind einige Adhäsine und extrazelluläre Toxine denen von *S. pseudintermedius* gleich oder sehr ähnlich (FOSTER, 2009; GEOGHEGAN et al., 2009). Eine Übersicht zu ausgewählten Pathogenitätsfaktoren von koagulase-positiven und koagulase-negativen Staphylokokken und deren Bedeutung gibt Tabelle II-1.

**Tabelle II-1: Wichtige Pathogenitätsfaktoren der Staphylokokken**

Pathogenitätsfaktoren	<i>S. aureus</i>	<i>S. pseud-intermedius</i>	KNS	Pathomechanismus
<b>Koagulase</b>	+	+	-	- Fibrinogen $\Rightarrow$ Fibrin - Schutz vor Phagozytose (SELBITZ et al., 2001)
<b>Clumping-Faktor A</b>	+	-	-	- Fibrinogenrezeptor - Schutz vor Phagozytose (O'BRIEN et al., 2002)
<b>Protein A</b>	+	+(MOODLEY et al., 2009)	-	- bindet am Fc-Stück von Immunglobulin G $\Rightarrow$ Keine Opsonierung - Schutz vor Phagozytose (UHLEN et al., 1984)
<b>Polysaccharid-Kapsel</b>	+	+	+	- Bildung einer Schleimkapsel - Schutz vor Phagozytose (NILSSON et al., 1997)
<b>Hämolysine</b>	+	+	(+)(GEMMEL & ROBERTS, 1973)	- Hämolysen und Zytotoxizität - dermonekrotische Wirkung ( $\alpha$ -Hämolysin) (DINGES et al., 2000; BHAKDI und TRANUM-JENSEN, 1991)
<b>Enterotoxine</b>	+	+(YOON et al., 2010)	(+)(NEMATİ et al., 2008)	- T-Zellaktivierung $\Rightarrow$ Apoptose oder massive Zytokin-Freisetzung (HENDRICKS et al., 2002)
<b>Exfoliativtoxine</b>	+	+(YOON et al., 2010)	(+)(ZELL et al., 2008)	- Angriff an Desmoglein 1 $\Rightarrow$ Zerstörung der Zell-Zell-Adhäsion (Epidermiolyse) (IYORI et al., 2010)
<b>Toxic-shock-syndrom-Toxin-1 (TSST-1)</b>	+	-	-	- T-Zell-Aktivierung $\Rightarrow$ Zytokinmedierte Vasodilatation und Endothelschädigung $\Rightarrow$ Hypovolämischer Schock (MIETHKE et al., 1993)
<b>Panton-Valentin Leukozidin</b>	+	-	-	- Massive Freisetzung von Entzündungsmediatoren und Leukozyten-Lyse durch Porenbildung in der Zytoplasmamembran (FINCK-BARBANCON et al., 1993; TRISTAN et al., 2007)

+ = vorhanden; - = nicht vorhanden; (+) = bei einem Teil der Stämme vorhanden

### 3.3. *S. pseudintermedius*

*S. pseudintermedius* wurde als neue Staphylokokken-Spezies erstmals 2005 benannt (DEVRIESE et al., 2005). Die Isolate stammten von Hund, Katze, Pferd und Papagei. Als phylogenetisch nah verwandt beschrieben wurden *S. intermedius* und *S. delphini*. Ab dem Jahr 1976 wurde *S. intermedius* als Staphylokokken-Spezies beim Tier benannt (HÁJEK, 1976). Im Jahr 2007 wurden 115

*S.-intermedius*-Isolate reklassifiziert, wobei anhand molekularbiologischer Methoden festgestellt wurde, dass alle Isolate von Hund, Katze und Mensch zur Spezies *S. pseudintermedius* zugeordnet werden konnten (SASAKI et al., 2007). Es kann davon ausgegangen werden, dass die meisten vorher identifizierten *S.-intermedius*-Stämme von Hunden in Wirklichkeit *S.-pseudintermedius*-Stämme sind, da bisher fast ausschließlich phänotypische Tests zur Speziesidentifizierung angewendet wurden. Heute bezeichnet man *S. pseudintermedius*, *S. intermedius* und *S. delphini* als sogenannte *S. intermedius*-Gruppe (SIG) (BANNOEHR et al., 2007).

*S. pseudintermedius* ist ein opportunistischer Erreger, welcher bei Hund, Katze und Pferd hauptsächlich Infektionen der Haut- und des Urogenitaltraktes verursacht (RUSCHER et al., 2009).

### **3.3.1. Methicillin-resistente *S. pseudintermedius***

Methicillin-resistente *S.-pseudintermedius*-Stämme (MRSP; in älterer Literatur auch als Methicillin-resistente *S. intermedius*, MRSI, bezeichnet) stellen ein therapeutisches Problem in der Tier- und in seltenen Fällen auch in der Humanmedizin dar. In den letzten Jahren konnte ein Anstieg an MRSP-Isolaten in klinischen Studien festgestellt werden (KANIA et al., 2004; MORRIS et al., 2006; SASAKI et al., 2007; HANSELMAN et al., 2008). Neben der Resistenz gegenüber  $\beta$ -Laktam-Antibiotika konnten Resistenzen gegenüber Fluorchinolonen, Tetrazyklinen, Lincosamiden, Aminoglykosiden, Chloramphenicol und Trimethoprim-Sulfonamiden nachgewiesen werden (VAN DUIJKEREN et al., 2008; FULHAM et al., 2011; FRANK et al., 2009). Meist konnte eine Wirksamkeit für Rifampicin, Mupirocin und Fusidinsäure festgestellt werden. Das Resistenzmuster korreliert dabei meist mit den gebräuchlich eingesetzten Antibiotika in der Tiermedizin (LOEFFLER et al., 2007; FRANK et al., 2009).

### **3.3.2. Bedeutung für Hund und Mensch**

Wie oben bereits erwähnt (s. 1.2. und 2.1.), gehört *S. pseudintermedius* zur Hautflora beim Hund, wird aber auch als der häufigste Erreger der Pyodermie beim Hund beschrieben (BANNOEHR et al., 2009). Eine Isolierung von *S. pseudintermedius* von der Haut ist daher sowohl beim erkrankten als auch beim gesunden Tier möglich. Da, wie in Abschnitt 1.2. beschrieben, Staphylokokken

am ehesten im oberen Respirationstrakt, der Maulhöhle und im Bereich des Anus vorkommen, ist eine Beprobung von Nasen- und Perineum-Schleimhaut eine geeignete Methode, um Staphylokokken auf dem Hund nachzuweisen (FAZAKERLEY et al., 2009).

*S.-pseudintermedius*- bzw. MRSP-Infektionen beim Menschen wurden gelegentlich beschrieben. Die Fallberichte haben in den letzten Jahren zugenommen (VAN HOOVELS et al., 2006; KEMPKER et al., 2009; CHUANG et al., 2010; STEGMANN et al., 2010). In einigen Fällen konnte der Kontakt zu Hunden nachgewiesen werden (CHUANG et al., 2010), oder sogar der gleiche *S.-pseudintermedius*-Stamm bei Hund und Besitzer bestimmt werden (KEMPKER et al., 2009). In der Humanmedizin können koagulase-positive *S. pseudintermedius* zunächst für *S. aureus* gehalten werden, weshalb deutlich höhere Infektionsraten von *S. pseudintermedius* beim Menschen vermutet werden (POTTURMARTHY et al., 2004; VAN HOOVELS et al., 2006; CHUANG et al., 2010).

Die Möglichkeit der nasalen Kolonisierung von Hundebesitzern und tiermedizinischem Fachpersonal ist bekannt (GUARDABASSI et al., 2004; HANSELMAN et al., 2009; MORRIS et al., 2010), wobei bisher nur von einer transienten Kolonisierung ausgegangen wird (FRANK et al. 2009; VINCZE et al. 2010). Bei einer Kolonisierung von Personal oder Besitzern besteht potentiell das Risiko einer Übertragung von MRSP auf andere Hunde. Eine Übertragung von *S. pseudintermedius* von Mensch zu Mensch konnte bisher nicht nachgewiesen werden. Weiterhin können unter Selektionsdruck Resistenzgene von MRSP auf andere Bakterien des Menschen wie beispielsweise *S. aureus* weitergegeben werden.

### **3.4. *S. aureus***

ROSENBACH (1884) isolierte erstmals *S. aureus* aus Wundinfektionen des Menschen. *S.-aureus*-Kolonien können auf Kulturmedien eine gold-gelbe Pigmentierung aufweisen, wodurch die Namensgebung erfolgte (KLOOS & SCHLEIFER, 1986). *S. aureus* ist das am häufigsten isolierte Pathogen bei Krankenhaus-assoziierten Infektionen und verursacht u.a. Abszesse, Endokarditiden, das Toxische Schock-Syndrom, Septikämien und Pneumonien (KLEVENS et al., 2007). Insgesamt sind 20-30 % der Menschen dauerhafte Träger von *S. aureus*, wobei die Nasenhöhle am häufigsten kolonisiert ist und

daher das Hauptreservoir dieses Erregers darstellt (HEYMANN, 2004). Weitere 30 % sind vorübergehend mit *S. aureus* besiedelt (WERTHEIM et al., 2005). Eine Kolonisierung erhöht das Risiko einer Infektion signifikant, da insbesondere bei Immunsuppression eine *S.-aureus*-Infektion entstehen kann (KLUYTMANS et al., 1997). Ebenso bedeutsam sind toxinbildende *S.-aureus*-Stämme bei Lebensmittelkontaminationen (ROSEC et al., 1997). Die zahlreichen Pathogenitätsfaktoren in Kombination mit verschiedenen Antibiotika-Resistenzen machen *S. aureus* zu einem weltweiten Gesundheitsproblem (s. 3.2. und 3.4.1.).

#### **3.4.1. Methicillin-resistente *S. aureus* und deren Bedeutung für Hund und Mensch**

Methicillin-resistente *S.-aureus*-Stämme (MRSA) wurden auf der Haut von gesunden Hunden und Hunden mit Haut-, Ohr-, Harnwegs- oder Knocheninfektionen nachgewiesen (BOOST et al., 2008; GRIFFETH et al., 2008; FAIRES et al., 2010). MRSA-Infektionen beim Hund sind in 60 % der Fälle Haut- und Ohrinfektionen. Das Risiko einer Infektion steigt signifikant bei vorheriger Antibiotikagabe oder intravenöser Katheterisierung (FAIRES et al., 2010). Hunde können ein Reservoir für MRSA darstellen (GUARDABASSI et al., 2004; LLOYD, 2007). Insbesondere kann MRSA auf die Besitzer oder das tiermedizinische Personal übertragen werden (WEESE et al., 2006; NIENHOFF et al., 2009). Bei der Charakterisierung von MRSA-Stämmen des Hundes konnte festgestellt werden, dass diese den humanmedizinischen Stämmen aus Krankenhäusern sehr ähnlich sind, so dass Kreuzübertragungen zwischen Hund und Besitzer sehr wahrscheinlich sind (MALIK et al., 2006; STROMMENDER et al., 2006). In der Humanmedizin erfolgt eine Einteilung in „hospital-associated“- (HA-MRSA), „community-associated“- (CA-MRSA) und „livestock-associated“-MRSA (LA-MRSA; LOWY, 2003). HA-MRSA werden vor allem bei hospitalisierten Patienten oder Krankenhauspersonal nachgewiesen. CA-MRSA sind in der Bevölkerung verbreitet und nicht unbedingt mit einem Krankenhausaufenthalt assoziiert (EADY & COVE, 2003). Charakteristisch für CA-MRSA ist Vorhandensein des Panton-Valentin-Leukozidins (s. Tabelle II-1, Seite 15; LOWY, 2003). LA-MRSA kommen vor allem bei landwirtschaftlichen Nutztieren und Personen mit engem Kontakt zu Nutztieren vor.

### 3.5. Koagulase-negative Staphylokokken

KNS sind einer der Haupterreger nosokomialer Infektionen beim Menschen (STOCK, 2007), gehören aber auch zur normalen kutanen Mikroflora von Mensch und Hund (s. 1.2.). Bei Isolierung der KNS aus klinischen Proben kann die Einordnung, ob KNS nur als Teil der normalen Hautflora in der Probe gefunden werden oder tatsächlich an der Infektion beteiligt sind, erschwert sein (ZIEBUHR et al., 2006). Am häufigsten sind Immunsupprimierte von einer Infektion betroffen (RODRÍGUEZ-ARANDA et al., 2009).

Der wichtigste Virulenzfaktor von KNS ist die Möglichkeit der Biofilmbildung als Ursache von Implantat-assoziierten Infektionen (MACK et al., 2006).

#### 3.5.1. Methicillin-resistente *Staphylococcus haemolyticus*

*S. haemolyticus* wird nach *S. epidermidis* am zweithäufigsten aus Blutkulturen isoliert (FALCONE et al., 2006). *S.-haemolyticus*-Isolate aus nosokomialen Infektionen sind in 55-75 % der Fälle Methicillin-resistent (SIERADZKI et al., 1998). Insgesamt weist *S. haemolyticus*, als erster Organismus mit einer Glycopeptid-Resistenz, die meisten Resistenzen aller KNS auf (BIAVASCO et al., 2000; CHIEW et al., 2007). Eine mögliche Ursache, auch der Resistenzentwicklung von *S. haemolyticus*, ist der gestiegene Selektionsdruck als ein Resultat des vermehrten Einsatzes von Breitspektrumantibiotika in Krankenhäusern (PFALLER & HERWALDT, 1988). Ein weiteres Problem sind Resistenzen gegen Desinfektionsmittel, insbesondere quaternäre Ammoniumverbindungen (s. 5.3.9.1. *qacA*), wodurch *S. haemolyticus* längere Zeit in Kliniken überleben kann (LEELAPORN et al., 1994; SAIDA et al., 2009).

In der Tiermedizin konnten Methicillin-resistente *S. haemolyticus* (MRSH) bei einer Katze mit postoperativer Wundinfektion nachgewiesen werden. Über Umgebungsuntersuchungen innerhalb dieser Klinik konnte epidemiologisch der gleiche Klon mehrfach in der chirurgischen Abteilung detektiert werden, obwohl das Hygienemanagement exzellent war (SIDHU et al., 2007). Neben einer Desinfektionsmittelresistenz könnte für den Nachweis trotz Hygienemanagement eine erhöhte Fitness der Bakterien ursächlich sein (SIDHU et al., 2002).

#### 3.5.2. Methicillin-resistente *S. epidermidis*

*S. epidermidis* ist einer der Haupterreger von nosokomialen Infektionen beim Menschen (FAVRE et al., 2005). Diese Infektionen sind mit einer hohen

Morbidität und Mortalität assoziiert, vor allem, wenn multiresistente Stämme vorliegen. Bei 80-90 % der *S.-epidermidis*-Isolate aus Kliniken handelt es sich um Methicillin-resistente *S. epidermidis*. Auch bei gesunden Individuen kann häufig *S. epidermidis* nachgewiesen werden (HU et al., 1995; DIEKEMA et al., 2001).

*S. epidermidis* konnte in 11-25 % der Isolate von Ohrinfektionen und in 18 % der Isolate von Harnwegsinfektionen beim Hund nachgewiesen werden (LILENBAUM et al., 2000; PENNA et al., 2010; PENNA et al., 2010a). In der Studie von PENNA et al. (2010) waren alle *S.-epidermidis*-Isolate von Ohrinfektionen beim Hund multiresistent.

## **4. Charakterisierung von Staphylokokken**

### **4.1. Identifizierung von Staphylokokken**

#### **4.1.1. Identifizierung von Staphylokokken mittels MALDI-TOF MS**

Die “Matrix assisted laser desorption ionization-time of flight” Massenspektrometrie (MALDI-TOF MS) ist eine im Vergleich zu konventionellen phänotypischen oder molekularbiologischen Verfahren schnelle, präzise und kostengünstige Methode für die Identifizierung von intakten Bakterien (CARBONNELLE et al., 2011). Bei der Massenspektrometrie werden die zu untersuchenden Moleküle des Bakteriums (in der Regel Proteine) in die Gasphase überführt und ionisiert. Die Ionen werden in einem elektrischen Feld beschleunigt und anschließend nach dem Masse-zu-Ladung-Verhältnis  $m/q$  getrennt. Die bei dieser Proteomanalyse gewonnenen Daten werden mit einer Datenbank abgeglichen, wodurch die Genus- bzw. Speziesidentifizierung erfolgt (CARBONNELLE et al., 2011).

Sowohl *S. aureus* als auch KNS wie *S. haemolyticus* und *S. epidermidis* können mit MALDI-TOF MS sicher identifiziert werden (CARBONNELLE et al., 2007; DUBOIS et al., 2010). Eine Studie von DECRISTOPHORIS et al. (2011) konnte auch eine zuverlässige Identifizierung von Staphylokokken-Stämmen der SIG (s. 3.3.) nachweisen. Daher kann MALDI-TOF MS als eine schnelle, effektive und geeignete Methode für die Identifizierung von Staphylokokken angesehen werden (DUBOIS et al., 2010; DECRISTOPHORIS et al., 2011).

#### **4.1.2. 16S-rRNA-Sequenzierung von Staphylokokken**

Die meisten Bakterien besitzen mehrere Kopien des 16S-rRNA-Gens auf dem



Chromosom. Die Sequenzvarianten zwischen den verschiedenen Kopien des 16S-rRNA-Gens scheinen relativ gering zu sein (CILIA et al., 1996). Die Sequenzierung der 16S-rRNA-Gene ermöglicht die Identifizierung von vielen Bakterien auf Speziesebene (PATEL, 2001). Sowohl *S. aureus* als auch KNS können über die 16S-rRNA-Sequenzierung identifiziert werden. Nahe verwandte Staphylokokken-Spezies wie die der SIG (s. 3.3.) können nicht über diese Methode unterschieden werden (HEIKENS et al., 2005; GHEBREMEDHIN et al., 2008). Die 16S-rRNA-Sequenzierung eignet sich prinzipiell auch für die Erkennung von Stämmen, welche phänotypisch schwierig zu identifizieren sind, oder um eine phänotypische Identifizierung abzusichern (BOERLIN et al., 2003). Von Nachteil ist, dass es sich um ein relativ arbeitsintensives und teures Verfahren im Verhältnis zu anderen Methoden handelt. Daher wird die 16S-rRNA-Sequenzierung nicht routinemäßig in der tiermedizinischen Diagnostik eingesetzt (BOERLIN et al., 2003).

#### **4.1.3. Identifizierung von *S. pseudintermedius* mittels *pta*-PCR-RFLP**

Aufgrund der nahen Verwandtschaft der SIG (s. 3.3.) wurde für die Speziesidentifizierung von *S. pseudintermedius* eine PCR mit anschließendem Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP) entwickelt (BANNOEHR et al., 2009). Der Genlocus *pta*, welcher für das Enzym Phosphoacetyltransferase kodiert, enthält eine *MboI*-Restriktionsstelle in *S.-pseudintermedius*-Isolaten, jedoch nicht in *S. intermedius* und *S. delphini* (BANNOEHR et al., 2009). Bei der PCR entsteht ein *pta*-Produkt von 320 bp Länge, welches durch das Enzym *MboI* in zwei Fragmente von 213 bp und 107 bp Länge geschnitten wird. In der Studie von SLETTEMAS et al. (2010) wurden 200 kanine Staphylokokken-Isolate über die *pta*-PCR mit anschließendem RFLP bestimmt. Nur 1 % der *S.-pseudintermedius*-Isolate wurde aufgrund der Heterogenität der *MboI* Restriktionsstelle falsch klassifiziert. Daher kann diese Methode als für die Routinediagnostik ausreichend zuverlässig angesehen werden (SLETTEMAS et al., 2010).

#### **4.2. Phänotypische Empfindlichkeitsbestimmung**

Eine Empfindlichkeitsbestimmung ist essentiell für die Wahl eines geeigneten Antibiotikums als therapeutische Option (s. 2.5.2.). Außerdem besteht eine Korrelation zwischen dem phänotypischen Nachweis einer Oxacillin- oder



Cefoxitin-Resistenz und dem Vorhandensein des *mecA*-Gens (CAUWELIER et al., 2004; FESSLER et al., 2010). Anzüchtungsbedingungen wie Temperatur oder NaCl-Konzentration sind unabhängig von der eingesetzten Untersuchungsmethode entscheidend für die Expression einer Resistenz (SUTHERLAND & ROLLINSON, 1964; ANNEAR, 1968).

#### **4.2.1. Agardiffusionstest**

Die am häufigsten genutzte Methode für die Erstellung eines Antibigramms ist der Agardiffusionstest nach BAUER et al. (1966). Es handelt sich um ein einfaches und kostengünstiges Verfahren, bei dem die Anzahl der zu untersuchenden Antibiotika variiert werden kann (SAINI et al., 2011). Der Agardiffusionstest wird in der Routinediagnostik eingesetzt. Eine standardisierte Methode mit Beurteilungskriterien für die Veterinärmedizin wird vom Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) vorgegeben (CLSI, 2008). Bei dieser Methode kann nur ein qualitatives Resultat angegeben werden, indem Stämme als sensibel, intermediär oder resistent gegen ein bestimmtes Antibiotikum beurteilt werden (SAINI et al., 2011).

#### **4.2.2. Bouillon-Mikrodilution**

Die Bestimmung der Minimalen Hemmkonzentration (MHK) verschiedener Antibiotika über Bouillon-Mikrodilution gilt als Referenzmethode für die Erstellung eines Antibigramms (CLSI, 2008). Die MHK bezeichnet die niedrigste Konzentration, bei der das Wachstum eines Bakterienstammes durch eine antibakterielle Substanz verhindert wird. Ein standardisiertes Verfahren (CLSI, 2008) wird benötigt, da beispielsweise die Menge des Bakterien-Inokulums entscheidend für die Sensitivität und Spezifität des Tests ist. Außerdem können höhere NaCl-Konzentrationen zu falsch-resistenten Ergebnissen führen (HUANG et al., 1993). Die MHK-Werte von Oxacillin und Cefoxitin werden häufig für den phänotypischen Nachweis einer *mecA*-medierten Resistenz genutzt (BEMIS et al., 2009; FESSLER et al., 2010). In der Studie von FESSLER et al. (2010) erfolgte die Oxacillin-Resistenzbestimmung für KNS mittels Bouillon-Mikrodilution und Agardiffusionstest. Es konnte nachgewiesen werden, dass neun *mecA*-negative Isolate über die Bouillon-Mikrodilution nach CLSI-Kriterien (2008) als Oxacillin-resistent eingestuft wurden. Über den Agardiffusionstest wurde lediglich ein Isolat der KNS fälschlicherweise als

resistent eingestuft. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die derzeit angegebenen Hemmhofdurchmesser für eine Oxacillin-Resistenz bei KNS besser geeignet sind für den Nachweis einer *mecA*-medierten Resistenz als die entsprechenden MHK-Grenzwerte (CLSI, 2008).

#### **4.2.3. Selektivmedien für das Screening auf Methicillin-resistente Staphylokokken**

Der Gebrauch von Selektivmedien für die direkte Isolierung und Identifizierung von MRSA aus klinischen Proben ist in der Humanmedizin gebräuchlich (ALTALIB et al., 2010; FRENCH, 2009). Mehrere kommerziell erhältliche Selektivmedien sind derzeit auf dem Markt. Die meisten Screening-Platten enthalten Oxacillin oder Cefoxitin als Inhibitor. Verschiedene Indikatorsysteme werden verwendet, um über einen Farbumschlag das Vorhandensein von MRSA-Kolonien zu verdeutlichen (BROWN et al., 2005). Bisher gibt es keine Selektivmedien für den spezifischen Nachweis von MRSP aus klinischen Proben. In einigen Studien wurden MRSA-Selektivmedien wie der Mannitol Salt Agar mit Oxacillin für die direkte Identifizierung von MRSP genutzt (HANSELMAN et al., 2008; MURPHY et al., 2009). Ebenso wurde die Methicillinresistenz von *S. pseudintermedius* über den Oxacillin Resistance Screening Agar bestätigt (POTTUMARTHY et al., 2004; SOEDARMANTO et al., 2011).

#### **4.3. Typisierungsverfahren für Staphylokokken**

Um effektive Strategien gegen die Ausbreitung von Methicillin-resistenten Staphylokokken, insbesondere MRSA, entwickeln zu können, werden Kenntnisse im Bereich der molekularen Evolution dieser Erreger benötigt. In den letzten Jahren wurden mehrere molekulare Typisierungsmethoden entwickelt (DEURENBERG & STOBBERINGH, 2008). Am häufigsten wurden die Makrorestriktion mit anschließender Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE), die *spa*-Typisierung, die SCC*mec*-Typisierung und die Multilocus-Sequenz-Typisierung (MLST) genutzt (AIRES DE SOUSA & DE LENCASTRE, 2004; PERRETEN et al., 2010).

##### **4.3.1. Pulsfeld-Gelelektrophorese**

Die PFGE war bis zur Etablierung von MLST und *spa*-Typisierung der Goldstandard für die Untersuchung von MRSA-Ausbrüchen in Krankenhäusern. Bei dieser Methode wird die chromosomale DNA über das Restriktionsenzym

*Sma*I in wenig große Fragmente geschnitten (s. Tabelle II-2) und durch die wechselnde Richtung des elektrischen Feldes während der PFGE aufgetrennt (DEURENBERG & STOBBERINGH, 2008). Die Vergleichbarkeit dieser Methode zwischen den Laboratorien ist zweifelhaft. Versuche zur Standardisierung dieses Typisierungsverfahren wurden unternommen, jedoch hat sich bisher international kein Protokoll durchgesetzt (MURCHAN et al., 2003).

<b>1</b>	<b>673,7 kb</b>
<b>2</b>	<b>361 kb</b>
<b>3</b>	<b>324 kb</b>
<b>4</b>	<b>275 kb</b>
<b>5</b>	<b>262 kb</b>
<b>6</b>	<b>208 kb</b>
<b>7</b>	<b>175 kb</b>
<b>8</b>	<b>135 kb</b>
<b>9</b>	<b>117 kb</b>
<b>10</b>	<b>80 kb</b>
<b>11</b>	<b>44 kb</b>
<b>12</b>	<b>36 kb</b>
<b>13</b>	<b>10 kb</b>
<b>14</b>	<b>9 kb</b>

**Tabelle II-2: Fragmentgrößen des *S.-aureus*-Stammes 8325 nach *Sma*I-Verdau und Pulsfeld-Gelelektrophorese**

#### **4.3.2. Typisierung des *spa*-Gens**

Bei der *spa*-Typisierung werden Sequenz-Varianten der polymorphen Region X des Protein-A (*spa*)-Gens bestimmt. Die Verschiedenheit des *spa*-Gens, welches durch mehrere Repeats von 24 bp Länge charakterisiert ist, beruht auf Punktmutationen sowie der Deletion oder Duplikation von Repeats (KAHL et al., 2005). Die Typisierung des *spa*-Gens kann sowohl bei Studien über die molekulare Evolution als auch bei Krankenhaus-assoziierten MRSA-Ausbrüchen angewendet werden (KOREEN et al., 2004). MOODLEY et al. (2009) entwickelten eine Sequenzanalyse des *spa*-Gens für MRSP, so dass seitdem auch MRSP-Isolate über eine *spa*-Typisierung epidemiologisch analysiert werden konnten. In Europa dominiert bei MRSP der *spa*-Typ t02, während in den USA t06 am häufigsten vorkommt (MOODLEY et al., 2009; PERRETEN et al., 2010). Die *spa*-Typisierung ist ein im Vergleich zur MLST (siehe 4.3.4) kostengünstiges und rationelles Verfahren, welches daher vielfach für Studien über die klonale Ausbreitung von MRSA und MRSP genutzt wird (PERRETEN et al., 2010; STROMMENDER et al., 2008).

#### 4.3.3. SCCmec-Typisierung

Für die SCCmec Typisierung wurden mehrere PCR-basierte Methoden entwickelt (ITO et al., 2001; OLIVERA & DE LENCASTRE, 2002; KONDO et al., 2007). Eine Einteilung der verschiedenen Haupt- und Subtypen von MRSA, MRSP und Methicillin-resistenten KNS ist unter 5.2. aufgeführt. Aufgrund der verschiedenen SCCmec-Typen und der Entdeckung immer neuer Varianten ist eine Einstufung nur über mehrere Multiplex-PCR-Methoden möglich (KONDO et al., 2007).

#### 4.3.4. Multilocus-Sequenz-Typisierung

Bei der MLST von MRSA handelt es sich um eine Sequenzanalyse von Bereichen einiger Haushaltsgene (*arcC*, *aroE*, *glpF*, *gmk*, *tpi* und *yqil*), durch die die Verwandtschaft aller weltweit isolierten MRSA ermittelt wird. Die sieben Gene kodieren für wichtige Stoffwechseleigenschaften des Bakteriums und werden daher konservativ vererbt (ENRIGHT et al., 2002). Die Gensequenzen werden über eine Online-Datenbank ([www.mlst.net](http://www.mlst.net)) einzelnen Alleltypen zugeordnet, aus denen sich dann der eigentliche Sequenztyp ergibt (WALTHER et al., 2006). Tiermedizinisch relevant ist der MLST-Typ ST 398, welcher vor allem bei *S. aureus*-Isolaten von Schweinen und Kühen nachgewiesen werden kann. MLST-Typ ST 398 konnte auch bereits von Hunden isoliert werden (WITTE et al., 2007). In den letzten Jahren hat dieser epidemiologische Klon auch Einzug in die Humanmedizin gehalten (KÖCK et al., 2009).

Für MRSP erfolgt bei der MLST eine Sequenzanalyse von Bereichen der folgenden Haushaltsgene: 16S rRNA, *cpn60*, *tuf*, *pta* und *agrD* (BANNOEHR et al., 2007). MRSP ST 71 ist der dominante Sequenztyp in Europa (BANNOEHR et al., 2007; PERRETEN et al., 2010), während in den USA hauptsächlich ST 68 vorkommt (BLACK et al., 2009).

Die MLST eignet sich gut für langfristige Analysen und die Aufklärung von epidemiologischen Entwicklungen (AMMON et al., 2001).

#### 4.3.5. Microarray-basierte Genotypisierungen

Der Microarray ist ein molekularbiologisches System für die Untersuchung von DNA, Proteinen oder Kohlehydraten (GARNEAU et al., 2010; FORSTER et al., 2003; FIGEYS, 1999). Die DNA-Microarray-Technologie ermöglicht die Bestimmung von vielen Einzelgenen in einer einzigen Reaktion und wurde bisher hauptsächlich für die Genomanalyse genutzt (Garneau et al. 2010). Für die

Bestimmung der Virulenzfaktoren und Resistenzgene von *S. aureus* wurden spezifische DNA-Microarrays entwickelt (MONECKE & EHRICHT, 2005; ZHU et al., 2007). Hierbei befinden sich auf einer Trägeroberfläche immobilisierte Sonden, welche spezifisch für verschiedene Gene von *S. aureus* sind. Die DNA des zu untersuchenden Probenmaterials wird mittels einer Multiplex-PCR linear amplifiziert (s. Material und Methoden 2.2.6.3.). Die zugegebenen Nukleotide sind biotin-markiert. Anschließend erfolgt die Hybridisierung der biotin-markierten DNA-Fragmente an den komplementären Teil der Sonden. Streptavidin, welches an eine Meerettich-Peroxidase gebunden ist, bindet an das Biotin der DNA-Fragmente. Die Anfärbung der gebundenen Komplexe erfolgt durch Zugabe des Substrates der Meerettich-Peroxidase (MONECKE et al., 2008). Eine detaillierte Beschreibung der Vorgehensweise befindet sich im Material- und Methodenteil (s. 2.2.6.7).

## **5. Resistenzen bei Staphylokokken**

### **5.1. Allgemeine Resistenzproblematik**

Zwei Jahre nach der Einführung von Penicillin als erstes klinisch anwendbares Antibiotikum im Jahre 1940 konnten Resistenzen gegen Penicillin beobachtet werden (PLOUGH, 1945). Seit diesem Zeitpunkt sind immer wieder neue Antibiotika mit verschiedenen Wirkungsmechanismen entwickelt worden. Nahezu genauso schnell haben die Bakterien aufgrund des Selektionsdruckes Resistenzen entwickelt (WERCKENTHIN et al., 2001; LOWY, 2003; DEURENBERG & STOBBERINGH, 2008). Der Begriff „Multiresistenz“ ist nicht klar definiert. Wenn nur eine phänotypische Resistenzbestimmung durchgeführt wurde, können Bakterienstämme, welche gegen mehr als drei Antibiotikaklassen Resistenzen aufweisen, als multiresistent bezeichnet werden. Bei zusätzlicher Bestimmung der Resistenzgene anhand molekularbiologischer Untersuchungen sollte auf dieser Ebene die Multiresistenz definiert werden. Es sollten bei den Bakterien-Isolaten drei oder mehr Resistenzgene vorhanden sein, welche mit unterschiedlichen phänotypischen Resistenzen assoziiert sind (SCHWARZ et al., 2010).

Die Resistenz gegenüber Cephalosporinen ist bei *S. pseudintermedius* und *S. aureus* in Europa nach wie vor vergleichsweise niedrig (LOEFFLER et al., 2007; SCHWARZ et al., 2008). In den letzten Jahren wurde jedoch eine Zunahme anderer Resistenzen bei Staphylokokken beobachtet (LLOYD, 2007). Darüber

hinaus wird der Gefahr, die mit einer Besiedlung von Menschen und Tieren mit multiresistenten Bakterien einhergeht, zunehmend Beachtung geschenkt. Insbesondere die Übertragung resistenter Bakterien zwischen Klein- und Heimtieren und Besitzern bzw. Tierärzten ist in diesem Zusammenhang in der letzten Zeit in den Fokus geraten (MORRIS et al., 2010; STEGMANN et al., 2010; PAUL et al., 2011).

Viele KNS besitzen Resistenzen gegen verschiedene Antibiotikaklassen. In der Humanmedizin sind beispielsweise 80% der *S.-epidermidis*-Isolate aus Katheter-assoziierten Septikämien multiresistent (KOZITSKAYA, 2004). Aufgrund ihrer Fähigkeit, über horizontalen Gentransfer Resistenzgene z.B. auf *S. aureus* zu übertragen, sind sie ein Reservoir für neue Resistenztypen in pathogenen Bakterien (HANSEN & ERICSON SOLLID, 2006).

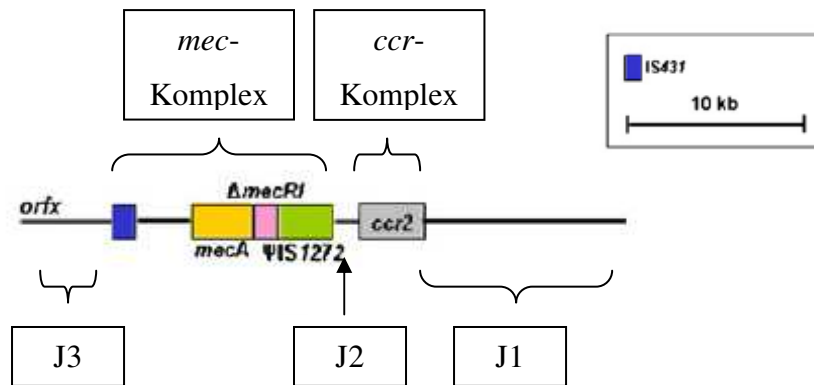
## **5.2. Mobile genetische Element (SCC*mec*)**

Die Staphylokokken-Chromosomen-Kassette *mec* (SCC*mec*) ist eine mobile genomische Insel, auf welcher das *mecA*-Gen lokalisiert ist. Eine Typisierung der SCC*mec* erfolgt über den *mec*-Komplex und die *ccr*-Gene. Der sogenannte *mec*-Komplex setzt sich aus den Genen *mecA*, *mecI*, *mecR1* und den Insertionssequenzen (IS) IS431 sowie IS1272 zusammen. Das *mecA*-Gen kodiert für ein Penicillin-bindendes-Protein 2a (PBP 2a), welches eine Resistenz gegenüber Methicillin und allen anderen  $\beta$ -Laktam-Antibiotika verursacht. Die nicht modifizierten Penicillin-Binde-Proteine (PBPs) sind für die Peptidoglycan-Synthese der Bakterien-Zellwand zuständig. Über die Bindung eines  $\beta$ -Laktam-Antibiotikums wird die Zellwand der Bakterien zerstört, an  $\beta$ -Laktam-Antibiotika gebundene PBP nicht für eine Zellwandsynthese zur Verfügung stehen. Das modifizierte PBP 2a hat eine niedrige Bindungsaffinität für  $\beta$ -Laktam-Antibiotika, so dass die Peptidoglycan-Synthese der Staphylokokken weiterhin erfolgt, und die Bakterien überleben. Eine Regulation des *mecA*-Gens erfolgt über den Repressor MecI und den transmembranösen  $\beta$ -Laktam Signal Transducer MecR1 (SCC*mec* Typ II und III). Die Gene für diese Regulatorproteine können auch durch eine verkürzte Version (Delta-MecR1) ersetzt sein (SCC*mec* Typ I, IV, V, VI, VII).

Die oben erwähnten Rekombinase-Gene (*ccr*) sind auf allen SCC*mec*-Elementen vorhanden. Ihre Funktion ist die Integration und Exzision der SCC*mec* in das bzw. aus dem Staphylokokken-Genom. Der *ccr*-Genkomplex besteht aus ein oder zwei

spezifischen Rekombinase-Genen: *ccrA1* und *ccrB1* (SCC*mec* Typ I), *ccrA2* und *ccrB2* (SCC*mec* Typen II und IV), *ccrA3* und *ccrB3* (SCC*mec* Typ III), *ccrA4* und *ccrB4* (SCC*mec* Typ VI und VIII) und *ccrC* (SCC*mec* Typen V und VII) (DEURENBERG & STOBBERINGH, 2008; ZHANG et al., 2011).

Bakterien, welche das *mecA*-Gen besitzen, werden als Methicillin-resistent bezeichnet. Bei Methicillin-resistenten *S. aureus* (MRSA) werden derzeit 8 Haupttypen der SCC*mec* (Typ I bis VIII) unterschieden (OLIVEIRA et al., 2001; HANSEN & ERICSON-SOLLID, 2006; ZHANG et al., 2011). Die SCC*mec* Typen I, IV, V, VI und VII verursachen nur eine Resistenz gegenüber  $\beta$ -Laktam-Antibiotika, während die SCC*mec* Typen II, III und VIII aufgrund der Integration von verschiedenen Resistenzgenen eine Resistenz gegenüber mehreren Antibiotikaklassen aufweisen (DEURENBERG & STOBBERINGH, 2008; ZHANG et al., 2011). Weitere Varianten der Haupttypen werden aufgrund der sogenannten Junkyard (J1-J3) Regionen unterschieden, so dass folgender Aufbau des SCC*mec* Elements zustande kommt: J3-*mec*-J2-*ccr*-J1 (KONDO et al., 2007). Die Abbildung II-2 gibt eine schematische Darstellung einer SCC*mec*-Kassette vom Typ IV.



**Abbildung II-2:** Schematische Darstellung einer SCCmec-Kassette vom Typ IV nach DEURENBERG & STOBBERINGH (2008). Aufgeführt sind die Hauptelemente für den SCCmec Typ IV: *ccr* Gene, IS431, IS1272, *mecA*, *mecI/R1* und der open reading frame (*orfX*).

Bei MRSP wurden bisher fünf verschiedene SCCmec-Typen (II-III, III, IV, V und VII-241) beschrieben (PERRETEN et al., 2010). SCCmec II-III besteht aus einer Kombination von SCCmec II von *S. epidermidis* und SCCmec III von *S. aureus* und besitzt charakterischerweise kein Kadmium-Resistenz-Operon (DESCLOUX et al., 2008). SCCmec V ist nahezu identisch zu SCCmec V von *S. aureus* (früher SCCmec V<sub>T</sub>) (BLACK et al., 2009). SCCmec VII-241 ist nicht verwandt mit SCCmec VII von *S. aureus* (BERGLUND et al., 2008; DESCLOUX et al., 2008).

Die SCCmec-Strukturen der KNS sind sehr variantenreich gegenüber denen von *S. aureus*. Daher sind auch einige *S. haemolyticus*- und *S. epidermidis*-Stämme mit dem derzeitigen Klassifikationsschema nicht typisierbar (GARZA-GONZÁLEZ et al., 2010, RUPPÉ et al., 2009).

Die Herkunft der SCCmec ist bisher nicht geklärt. Es wurde vermutet, dass das *mecA*-Gen-Homolog von *S. sciuri* der evolutionäre Vorläufer des *mecA*-Gen von MRSA ist (WU et al., 2001). *S.-sciuri*-Stämme sind Methicillin-empfindlich, werden aber in Anwesenheit von Methicillin aufgrund der erhöhten Transkriptionsrate des *mecA*-Gen-Homologes resistent. Eine neuere Studie (TSUBAKISHITA et al., 2010) vermutet die Entwicklung der SCCmec in



tierassoziierten Staphylokokkenspezies durch den Erwerb der intrinsischen *mecA*-Region von *S. fleuretti*.

### 5.3. Ausgewählte Resistenzgene der Staphylokokken

#### 5.3.1. Resistenzen gegen $\beta$ -Laktam-Antibiotika

Die  $\beta$ -Laktam-Resistenz von Staphylokokken wird durch die Produktion von  $\beta$ -Laktamase, welches durch das *blaZ*-Gen kodiert wird, oder durch die Produktion eines modifizierten Penicillin-Bindeproteins (PBP 2a), welches durch das *mecA*-Gen kodiert wird, verursacht (FUDA et al., 2005).

##### 5.3.1.1. *mecA*

(s. 3.2.)

##### 5.3.1.2. *blaZ*

Das Gen *blaZ* kodiert für eine  $\beta$ -Laktamase, die den  $\beta$ -Laktam-Ring von Penicillinen hydrolysiert. Die Regulation der Expression von *blaZ* erfolgt über die Bindung von  $\beta$ -Laktam-Antibiotika an Prometalloproteasen (BlaR1) auf der Zelloberfläche, welche als Sensorproteine fungieren. Die Bindung führt zur Spaltung von BlaR1 unter anderem zu einer aktivierten Metalloprotease, welche wiederum das Regulatorprotein BlaI spaltet. Durch die Spaltung von BlaI wird dessen repressive Wirkung aufgehoben und *blaZ* kann transkribiert werden (WALTHER et al., 2006; BLACK et al., 2011). Es sind bisher vier Varianten der *S.-aureus*- $\beta$ -Laktamase-Gene beschrieben worden (A,B , C und D) (KERNODLE et al., 1989; DYKE, 1997; VOLADRI & KERNODLE, 1998). Für *S. pseudintermedius* wurden hauptsächlich die  $\beta$ -Laktamase-Varianten A und B nachgewiesen (MALIK et al., 2007).

#### 5.3.2. Resistenzen gegen Aminoglykoside

Die Inaktivierung von Aminoglykosiden erfolgt über Enzyme wie Acetyltransferasen, Adenyltransferase, Nukleotidyltransferasen oder Phosphotransferasen, deren Gene (*aac*, *aad*, *ant* bzw. *aph*) meist auf Plasmiden oder Transposons lokalisiert sind, so dass ein horizontaler Gentransfer der Resistenzgene möglich ist (SCHWARZ & NOBLE, 1994; WOODFORD, 2005).

##### 5.3.2.1. *aphA-3*

Das Resistenzgen *aphA-3*, auch bekannt als *aph(3')*-IIIa wurde in *S.*

(*pseudointermedius* Isolaten von Hunden nachgewiesen und vermittelt eine Resistenz gegenüber Kanamycin, Neomycin und Streptothricin. *aphA-3* ist auf dem gleichen Transposon wie das *erm(B)* Gen lokalisiert, welches für eine Makrolid- und Lincosamid-Resistenz verantwortlich ist (5.3.3.1.) (BOERLIN et al., 2001; WERCKENTHIN et al., 2001).

#### **5.3.2.2. *aadD***

Das Resistenzgen *aadD* wird auch als *ant(4')-Ia* oder *aad(4')* bezeichnet und vermittelt eine Resistenz gegenüber Kanamycin und Neomycin. Das Plasmid pUB110 besitzt *aadD*, welches wiederum in die SCCmec integriert ist (MCKENZIE et al., 1986; DEURENBERG & STOBBERINGH, 2008).

#### **5.3.2.3. *aac-aphD***

Das Resistenzgen *aac-aphD* kodiert für ein bifunktionales Enzym mit Acetyl- und Phosphotransferase-Aktivität, wodurch sich eine Resistenz gegenüber Gentamicin, Kanamycin und Tobramycin ergibt. Dieses Gen ist mit dem Transposon Tn4001 assoziiert, welches integriert in ein Plasmid über horizontalen Gentransfer von Enterokokken auf Staphylokokken übertragen worden ist (NOBLE et al., 1996; WERCKENTHIN et al. 2001).

### **5.3.3. Resistenzen gegen Makrolide und Lincosamide**

Generell kann man drei Mechanismen der Resistenzentwicklung gegen Makrolide und Lincosamide unterscheiden. Zum einen ist eine Modifikation der 23S-rRNA möglich, wodurch das Antibiotikum nicht mehr an seine Zielstruktur binden kann. Weitere Resistenzmechanismen sind ein aktiver Efflux oder eine enzymatische Inaktivierung (SCHWARZ & NOBLE, 1994; WERCKENTHIN et al., 2001).

#### **5.3.3.1. *erm(A)*, *erm(B)* und *erm(C)***

Die *erm(A)*-, *erm(B)*- und *erm(C)*-Gene kodieren für eine 23S-rRNA-Methylase, welche eine Methylierung eines bestimmten Adenin-Restes der 23S-rRNA bewirkt. Durch die Methylierung in seiner Bindungsstelle kann das jeweilige Antibiotikum nicht mehr spezifisch angreifen. Die *erm(A)*- und *erm(B)*-Gene werden meist auf Transposons wie Tn554 gefunden, hingegen ist *erm(C)* auf Plasmiden lokalisiert. Die Methylasegene *erm(A)* und *erm(C)* kommen am häufigsten bei *S. aureus* und KNS des Menschen vor (LINA et al. 1999). Bei kaninen *S. (pseudointermedius* Isolaten konnte vor allem *erm(B)* als Resistenzgen

detektiert werden (BOERLIN et al., 2001).

#### **5.3.3.2. *linA***

Das *linA*- und das *linA'*-Gen vermitteln eine Resistenz gegenüber Lincosamiden und kodieren für eine Nucleotidyltransferase, welche die Nucleotidylierung der Hydroxygruppe in Position 4 von Lincomycin katalysiert. Das Gen *linA* ist für die Resistenz in KNS verantwortlich, während das *linA'* Gen in *S. aureus* vorkommt (LECLERCQ et al., 1987; ZHANG et al., 2011).

#### **5.3.3.3. *mpbBM* und *msrA***

Das *mpbBM*-Gen und das *msrA*-Gen kodieren für spezifische Makrolideeffluxpumpen (MONECKE et al., 2009; PÉREZ-VÁZQUEZ et al., 2009). Diese Effluxpumpen sind Membran-ATPasen, welche unter Energieverbrauch spezifisch oder unspezifisch Stoffe aus der Zelle befördern und somit die Wirkung eines Antibiotikums verhindern können (LI & NIKAIDO, 2004).

### **5.3.4. Resistenzen gegen Tetracykline**

Als erstes Tetracyklin-resistentes Bakterium wurde im Jahre 1953 *Shigella dysenteriae* isoliert (ROBERTS, 1996). Die häufigsten Resistenzmechanismen gegenüber dieser Antibiotikaklasse sind aktiver Efflux des Antibiotikums sowie die Produktion von ribosomalen Schutzproteinen (THAKER et al., 2010).

#### **5.3.4.1. *tet(K)***

Das Gen *tet(K)* kodiert für ein membranassoziiertes Protein, welches Tetracykline aus der Zelle transportiert. Durch den Export von Tetracyklinen aus der Zelle wird die intrazelluläre Antibiotika-Konzentration reduziert. Daher sind die Ribosomen innerhalb der Zelle vor dem Antibiotikum geschützt (CHOPRA & ROBERTS, 2001). Das *tet(K)*-Gen wird von allen Tetracyklin-Resistenzgenen am häufigsten in *S. aureus* nachgewiesen, kommt aber auch bei anderen Staphylokokkenspezies vor. Eine Ausnahme sind *S. (pseud)intermedius* Isolate, welche am häufigsten *tet(M)*-Gene tragen (SCHWARZ et al., 1998).

#### **5.3.4.2. *tet(M)***

Die *tet(M)*-Gene wurden sowohl bei gramnegativen, als auch bei grampositiven Bakterien nachgewiesen (THAKER et al., 2010). Sie sind häufig mit konjugativen

Transposons assoziiert. Die ribosomalen Schutzproteine, welche von *tet(M)* kodiert werden, ähneln strukturell bakteriellen Elongationsfaktoren. Die Bindung des ribosomalen Schutzproteins ist GTP-abhängig und führt zur Konformationsänderung des Ribosoms, wodurch gebundene Tetrazykline wieder freigesetzt werden (BURDETT, 1996).

#### **5.3.5. Resistenzen gegen Fluorchinolone**

Eine Fluorchinolon-Resistenz kann hervorgerufen werden durch eine schrittweise Mutation der Gene *gyr* und *gri*, welche für die Enzyme DNA-Gyrase und Topoisomerase IV kodieren (s. 2.5.2.2.) (DRLICA & ZHAO, 1997; EVERETT & PIDDOCK, 1998). Weiterhin führen Efflux-Pumpen wie NorA in Kombination mit anderen Resistenzmechanismen zur Ausbildung einer klinischen Fluorchinolon-Resistenz (NG et al., 1994).

Die Mutationsstellen innerhalb der Gene *gyr* und *gri* variieren bei den verschiedenen Staphylokokken-Spezies und führen zur Änderung der Aminosäuren-Zusammensetzung der entsprechenden Enzyme (PIDDOCK, 1999). Bei *S.-pseudintermedius*-Isolaten konnten erstmals von INTORRE et al. (2007) Änderungen im Bereich GyrA-84 und GriA-80 festgestellt werden, welche zur Fluorchinolon-Resistenz führen. Bei *S. aureus* konnten die Mutationen hauptsächlich an den Positionen 84 oder 88 für *gyrA* und an den Positionen 80 oder 84 für *griA* gefunden werden (YAMAGISHI et al., 1996; HOOPER, 2002).

#### **5.3.6. Resistenzen gegen Chloramphenicol**

Verschiedene Mechanismen können zur Resistenz gegenüber Chloramphenicol führen. Der häufigste ist die enzymatische Inaktivierung des Antibiotikums durch Chloramphenicol-Acetyltransferasen (CAT). Außerdem können Chloramphenicol-Resistenzen durch Efflux-Systeme, eine Inaktivierung durch Phosphotransferasen oder durch Mutationen an der ribosomalen Angriffsstelle des Antibiotikums hervorgerufen werden (SHAW, 1983; MURRAY & SHAW, 1997).

Die *cat*-Gene sind auf verschiedenen Plasmiden lokalisiert und kodieren für CAT, welche über eine Acetylierung das Chloramphenicol inaktivieren (MURRAY & SHAW, 1997; SCHWARZ et al., 2004).

### 5.3.7. Resistenzen gegen Mupirocin

Bei der Mupirocinresistenz wird zwischen einer „Low Level“-Resistenz (MHK (s. 5.2.2.) 8-256 mg/l) und einer „High Level“-Resistenz (MHK  $\geq$  512 mg/l) unterschieden (GILBART et al., 1993). „Low Level“-Resistenz entsteht durch Mutation des chromosomalen Gens, welches für die Isoleucyl-tRNA-Synthetase kodiert (s. 2.5.2.1.) (FARMER et al., 1992; HURDLE et al., 2004). Bei der „High Level“-Resistenz handelt es sich um eine plasmidmedierte Resistenz durch das *mupA*-Gen, welches für ein modifiziertes Enzym mit großer Ähnlichkeit zur eukaryotischen Isoleucyl-tRNA-Synthetase kodiert (HODGSON et al., 1994).

Mupirocinresistenzen in klinischen Isolaten von *S. aureus* und KNS sind bekannt. Auch in Methicillin-resistenten Stämmen wurden Resistenzen gegenüber Mupirocin beobachtet (KRESKEN et al., 2004). Bisher konnte lediglich bei einem *S. pseudintermedius*-Isolat von einem Hund mit oberflächlicher Pyodermie eine Mupirocinresistenz nachgewiesen werden (FULHAM et al., 2011).

### 5.3.8. Resistenzen gegen Fusidinsäure

Resistenzen gegen Fusidinsäure können durch Mutation des *fusA*-Gens entstehen, welches für den EF-G kodiert (s. 2.5.2.1.). Der Austausch von Aminosäuren im EF-G führt zur verringerten Affinität von Fusidinsäure an seine Bindungsstelle (BESIER et al., 2003; LANNERGARD et al., 2009). Plasmidmedierte Resistenzgene wie *fusB*, *fusC* und *fusD* kodieren für Schutzproteine des EF-G und stellen den häufigsten Resistenzmechanismus dar (O'NEILL et al., 2007).

In den letzten Jahren wurde außerdem von einem Fusidinsäure-Resistenzprotein „Q6GD50“ bei Methicillin-resistenten und Methicillin-sensiblen *S.-aureus*-Stämmen berichtet (HOLDEN et al., 2004; SCICLUNA et al., 2010). Andere Resistenzmechanismen, wie beispielsweise Efflux-Systeme, haben bisher bei Staphylokokken keine Bedeutung (CASTANHEIRA et al., 2010).

In der Studie von CASTANHEIRA et al. (2010) wurden Staphylokokken-Isolate von Human-Patienten mit Infektionen des Respirationstraktes, der Haut sowie mit Septikämien untersucht. In Deutschland kommen Fusidinsäureresistenzen bei 2-3 % der *S.-aureus*-Isolate vor. Bei KNS ist mit höheren Resistenzraten von bis zu 33 % der Isolate zu rechnen (CASTANHEIRA et al., 2010). Studien zu Fusidinsäureresistenzen bei *S. pseudintermedius*-Isolaten ergaben kontroverse Ergebnisse. Während in der Studie von LOEFFLER et al. (2008) keine

Fusidinsäure-Resistenz nachgewiesen werden konnte, waren in der Studie von NORSTRÖM et al. (2009) 49 % der *S.-pseudintermedius*-Isolate resistent.

### 5.3.9. Unspezifische Effluxpumpen

Unspezifische Effluxpumpen sind verantwortlich für Resistenzen gegen Antibiotika, Antiseptika und Desinfektionsmittel (GRINIUS et al., 1992). Die klinische Relevanz der Effluxsysteme ist vor allem bei nosokomialen Infektionen gegeben. In der Studie von NOGUCHI et al. (1999) konnte bei klinischen MRSA-Isolaten eine Antiseptika-Resistenz von 70 % nachgewiesen werden. Studien über Desinfektionsmittel-Resistenzen bei *S.-pseudintermedius*-Isolaten sind bisher nicht durchgeführt worden. GUARDABASSI et al. (2009) konnte jedoch nachweisen, dass ein Ohr-Antiseptikum mit Chlorhexidin und Tris-EDTA (Tris-Ethylen-diamin-tetraessigsäure) bei Hunden mit Ohrinfektion gegen *S.-pseudintermedius*-Isolate wirksam war. KNS besitzen häufig Resistenzen gegenüber Desinfektionsmitteln und können sogar in Desinfektionsmittelflaschen überleben (SAIDA et al., 2009).

#### 5.3.9.1. *qacA*

Das Plasmid-mediierte *qacA* Gen kodiert für einen Efflux-Transporter für verschiedene Antiseptika bzw. Desinfektionsmittel (unter anderem Biguanide und quaternäre Ammoniumverbindungen). Diese Effluxpumpe gehört aufgrund der Aminosäure-Zusammensetzung zur „Major facilitator Superfamily“ (MFS), welche eine große Anzahl an membrangebundenen Transportproteinen einschließt (SAIDIJAM et al., 2006).

### III. MATERIAL UND METHODEN

#### 1. Material

##### 1.1. Patientengut

In die Studie eingeschlossen wurden Hunde mit rezidivierender oder nicht auf Antibiotika ansprechende Pyodermie oder Otitis. Insgesamt wurden Proben von 27 Hunde-Besitzer-Paaren gesammelt, welche in der Medizinischen Kleintierklinik der LMU München, der Tierklinik Oberhaching und der Tierklinik Haas & Link vorgestellt wurden. Die Diagnose Pyodermie oder Otitis wurde gestellt anhand der Patientenanamnese, der klinisch sichtbaren Läsionen und dem zytologischen Nachweis von Kokken.

##### 1.2. Bakterienstämme (Kontrollstämme)

Die in dieser Studie genutzten Referenzstämme sind in Tabelle III-1 aufgeführt. Sie stammen aus der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen (DSM), der National Collection of Type Cultures (NCTC) oder dem BfT GermVet Monitoring Programm (SCHWARZ et al., 2007).

**Tabelle III-1: Referenzstämme**

Bezeichnung	Beschreibung
DSM 21284	Methicillin-sensible <i>S. pseudintermedius</i> (MSSP)
DSM 20373	<i>S. intermedius</i> Methicillin-sensibel (MSe)
DSM 20771	<i>S. delphini</i> -MSe-
DSM 2569	<i>S. aureus</i> -MSe-
DSM 2570	<i>Enterococcus faecalis</i>
DSM 20477	<i>Enterococcus faecium</i>
2943 BfT	MRSA
2251 BfT	<i>Pseudomonas (Ps.) aeruginosa</i>
NCTC 8325	<i>S. aureus</i> (Größenstandard für Makrorestriktionsanalyse)

### 1.2.1. Medien, Lösungen und Puffer

Zusammensetzung von Medien, Lösungen, Puffern und kommerziell erhältlichen Kits sind bei der ersten Erwähnung im Text unterstrichen und in Anhang IX.1. aufgeführt.

### 1.2.2. Selektivmedien

Die in der Vorstudie untersuchten Selektivmedien sind in Tabelle III-2 aufgeführt.

**Tabelle III-2: Selektivmedien**

<b>Selektivmedien</b>	<b>Abkürzung</b>	<b>Hemmstoff</b>	<b>Indikator</b>
<b>Mannitol Salt Agar mit Oxacillin (BD Diagnostics, Heidelberg, Deutschland)</b>	MSA	Oxacillin (5 mg/l)	Mannitol (10 g/l)
<b>BD BBL<sup>TM</sup> CHROMagar<sup>TM</sup> MRSA (BD Diagnostics)</b>	CHROMagar	Cefoxitin (6 mg/l) und andere Hemmstoffe	Chromogen (0,5 g/l)
<b>chromID<sup>TM</sup> MRSA agar<sup>1</sup> (bioMérieux, Nürtingen, Deutschland)</b>	chromID	Cefoxitin (4 mg/l) und andere Hemmstoffe	Chromogen (0,4 g/l)
<b>Oxacillin Resistance Screening Agar Base (Oxoid, Wesel, Deutschland)</b>	ORSAB	Oxacillin (2 mg/l) Polymyxin B (50.000 IU)	Mannitol (10 g/l)
<b>Brilliance MRSA agar<sup>1</sup> (Oxoid)</b>	Brilliance	Keine Angabe des Herstellers	Chromogen (2 g/l)

<sup>1</sup> Zusammensetzung des Screening-Agars bis 03/2011.



### 1.2.3. Primer

Die in dieser Studie genutzten Primer sind in Tabelle III-3 aufgeführt.

**Tabelle III-3: Primer**

<b>Primer</b>	<b>Sequenz in 5'⇒3'Richtung</b>	<b>Literatur</b>
<b>bak1066r</b>	ACATTTCAACAACACGAGCTG	BARRY et al. (1990)
<b>bak41f</b>	GCTCAGATTGAACGCTGGCG	BARRY et al. (1990)
<b>mecAfor</b>	AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC	STROMMENDER et al. (2006)
<b>mecArev</b>	AGTTCTGCAGTACCGGATTTGC	STROMMENDER et al. (2006)
<b>pta_f1</b>	AAAGACAAACTTTCAGGTAA	BANNOEHR et al. (2009)
<b>pta_r1</b>	GCATAACAAGCATTGTACCG	BANNOEHR et al. (2009)
<b>SIspaF</b>	AACCTGCGCCAAGTTTCGATGAAG	MOODLEY et al. (2009)
<b>SIspaR</b>	CGTGGTTTGCTTTAGCTTCTTGGC	MOODLEY et al. (2009)
<b>spa 1113f</b>	TAAAGACGATCCTTCGGTGAGC	STROMMENDER et al. (2006a)
<b>spa 1514r</b>	CAGCAGTAGTGCCGTTTGCTT	STROMMENDER et al. (2006a)

### 1.2.4. Chemikalien und Enzyme

Die in dieser Studie verwendeten Chemikalien und Enzyme sind mit (\*) gekennzeichnet und werden im Anhang unter IX.2. mit den Bezugquellen aufgeführt.

### 1.2.5. Geräte und sonstige Materialien

Die in dieser Studie verwendeten Geräte und sonstigen Materialien sind mit (†) gekennzeichnet und werden im Anhang unter IX.3 mit den Bezugsquellen aufgeführt.

## 2. Methoden

### 2.1. Vorstudie Selektivmedien

Da für MRSP keine spezifischen Selektivmedien kommerziell erhältlich sind, wurden MRSA-Screening-Agars auf ihre Eignung für die Detektion von MRSP überprüft (s. Tabelle III-2 und 4.2.3.). Als Untersuchungstämmen wurden sowohl Referenz- (s. Tabelle III-1) als auch Feldstämmen von sieben verschiedenen Staphylokokkenspezies mit und ohne *mecA*-Gen genutzt. Außerdem wurden Bakterienspezies in die Vorstudie eingeschlossen, welche häufig zusammen mit Staphylokokken in Hautproben beim Hund vorkommen. Die Tabelle III-4 gibt eine Übersicht über die verwendeten Feldstämmen.

**Tabelle III-4: Feldstämmen**

Bezeichnung	Beschreibung
4162-07	<i>S. pseudintermedius</i> (MSe)
1679-07	<i>S. epidermidis</i> (MSe)
0005/92	<i>S. haemolyticus</i> (MSe)
1614-07 und 3980-07	MRSA
115-09, 126-09, 735-10, 1850-10, 1915-07, 2127-07, 3164-10, 3674-10, 6183-07, 6218-07	MRSP
46-02, 876-09, 2490-07, 2540-07, 4384-09	MRSE
2479-07, 2577-02, 2910-07, 3455-01, 3816-06	MRSH
4286-06	<i>S. sciuri</i> mit <i>mecA</i> -Gen
ÄS 26	<i>Enterococcus faecium</i>
4114-07	<i>Pr. mirabilis</i>
5371-05	<i>Klebsiella (K.) pneumoniae</i>
4385-06	<i>E. coli</i>

#### 2.1.1. Anzucht

Die zu untersuchenden Bakterienstämme wurden 24 h bei 37 °C bebrütet. Anschließend wurden zwei Kolonien mit einem Durchmesser von je 2 mm mittels Drei-Ösen-Ausstrich auf die Selektivplatten verbracht und 48 h bei 37 °C bebrütet. In Anlehnung an die Empfehlung des Herstellers wurden Ausstriche auf MSA zusätzlich bei 34 °C bebrütet. Das Bakterienwachstum wurde anhand der semiquantitativen Menge der Bakterien sowie der Größe und Farbe der

Einzelkolonien nach 24 und 48 h beurteilt. Alle Versuche wurden im Doppelansatz durchgeführt.

### 2.1.2. Mischungsversuche

Um den Einfluss von anderen Bakterien auf die Detektion von MRSP aus klinischen Proben zu untersuchen, wurden Mischungsversuche durchgeführt. Alle Selektivplatten wurden mit Mischungen von MRSP 6183-07 + MRSA 2943 BfT (1:1), MRSP 6183-07 + MSSP DSM 21284 (1:9), und MRSA 2943 BfT + MSSP DSM 21284 (1:9) inokuliert. MSA, ORSAB und Brilliance wurden zusätzlich mit folgenden Mischungen untersucht: MRSP 6183-07 + MRSA 2943 BfT (1:9 und 9:1), MRSP 6183-07 + *S. sciuri* 4286-06 oder *K. pneumoniae* 5371-05 oder *Pr. mirabilis* 4114-07 (1:1). Die Stämme wurden in physiologischer Kochsalzlösung auf eine Keimdichte von McFarland-Standard 1 eingestellt und anschließend in dem oben angegebenen Verhältnis gemischt. Der McFarland-Standard definiert die Trübung einer Bakteriensuspension und damit indirekt auch die Keimdichte in Kolonie-bildenden Einheiten (KBE)/ml. Zehn Mikroliter dieser Mischung wurden mittels Drei-Ösen-Ausstrich auf die Selektivplatten verbracht. Die Inkubation und Analyse der Selektivplatten erfolgte unter den oben genannten Bedingungen (s. 2.1.1.).

### 2.1.3. Semiquantitativer Bakteriennachweis

Um das MRSP-Wachstum auf den Selektivmedien und auf nicht-selektiven Blutagarplatten (BAP) quantitativ vergleichen zu können, wurden zusätzliche Versuche durchgeführt. Zunächst wurde eine Suspension der zu untersuchenden MRSP-Stämme mit einer Dichte von McFarland-Standard 0,5 hergestellt und anschließend eine Verdünnungsreihe in Zehnerstufen angefertigt, bis 100 µl physiologische Kochsalzlösung 10-100 KBE enthielten (Verdünnungsstufe 1:100 000). Diese Verdünnung wurde im Duplikat auf BAP und Selektivmedien ausgestrichen. Die Koloniezählung erfolgte nach 24 und 48 h Inkubation bei 37 °C. Zusätzlich wurde dieser Versuch für chromID und BAP mit den gleichen Konditionen wiederholt. Allerdings wurden alle Verdünnungsstufen ausgestrichen. Jeder Versuch wurde mindestens einmal wiederholt.

## **2.2. Hauptstudie**

### **2.2.1. Probennahme**

Die Hautläsionen bzw. Gehörgänge der erkrankten Hunde wurden mit einem sterilen Tupfer<sup>†</sup> abgestrichen und die Tupfer anschließend in ein Amies-Transportmedium verbracht. Weitere Tupfer wurden von folgenden Hautstellen entnommen: Nasenschleimhaut des linken und rechten Nasenvorhofes, Rachenschleimhaut, linke und rechte Vorderpfoten, inguinaler, perianaler Bereich sowie linke und rechte Gehörgänge, sofern noch nicht entnommen. Jede Stelle wurde 15 sec abgestrichen. Die Tupfer wurden bei Vorliegen von sehr trockenen Hautstellen mit steriler NaCl-Lösung angefeuchtet. Nasentupfer wurden entnommen, indem der Tupfer 0,5-1 cm in das jeweilige Nasenloch eingeführt wurde. Aufgrund der geringen Toleranz der Patienten erfolgte hier eine Probennahme über 2-5 sec.

Die Hundebesitzer wurden ebenfalls beprobt. Tupferproben wurden von folgenden Stellen genommen: Nasenschleimhaut des linken und rechten Nasenvorhofes, Rachenschleimhaut sowie rechte und linke Handinnenflächen. Die Probenentnahme erfolgte hier über 10-15 sec an jeder Stelle. Alle Tupferproben wurden bis zur kulturellen bakteriologischen Untersuchung im Kühlschrank bei 4 °C gelagert.

### **2.2.2. Patientendaten**

Vor der Probennahme wurde die Einwilligung der Besitzer eingeholt (s. Anhang IX 4.1). Hunde- und Besitzerdaten wurden über einen Fragebogen abgefragt, der sich vor allem auf den Umgang und den Kontakt mit dem Tier bezog (s. Anhang IX 4.2). Als weitere Eckdaten wurden festgehalten: Rasse des Tieres, Alter, Geschlecht, sonstige Erkrankungen des Tieres, Antibiotika-Therapie während der letzten drei Monate sowie derzeitiger Medikamenteneinsatz (s. Anhang IX 4.3).

### **2.2.3. Anzucht, Subkultivierung, Asservierung**

Innerhalb von 24 h wurden die gesammelten Proben auf einer BAP und ORSAB (s. Literaturübersicht 4.2.3. und Tabelle III-2) ausgestrichen. Die Agarplatten wurden für 18-24 h bei 37 °C aerob inkubiert. Zusätzlich wurde eine Anreicherungskultur angesetzt, um auch geringe Mengen an Staphylokokken nachweisen zu können (HANSELMAN et al. 2008). MRSP- oder MRSA-

verdächtige Kolonien wurden zur Erstellung von Reinkulturen zweimal auf BAP subkultiviert. Zur dauerhaften Asservierung wurden Glycerinkulturen\* der Isolate angelegt. Hierfür wurde eine Staphylokokken-Kolonie in 10 ml Brain-Heart-Infusion (BHI)-Medium bei 37 °C über Nacht inkubiert (Übernachtskultur). 870 µl dieser Übernachtskultur wurden mit 130 µl Glycerin versetzt und nach Abkühlung auf 4 °C bei -80 °C gelagert.

#### **2.2.4. Speziesidentifizierung**

##### **2.2.4.1. ORSAB**

Für die Untersuchung auf methicillin-resistente Staphylokokken wurde ORSAB als Screening-Agar genutzt. Die Kolonien wurden anhand ihrer Morphologie, Größe sowie Farbe beurteilt. Die Speziesidentifizierung verdächtiger Kolonien wurde anschließend mittels MALDI-TOF MS durchgeführt. Beim Vorliegen von Mischkulturen wurden zunächst Subkulturen auf BAP angelegt.

##### **2.2.4.2. MALDI-TOF MS**

Die Speziesidentifizierung wurde mittels MALDI-TOF MS mit Hilfe des Microflex LT Systems<sup>†</sup> durchgeführt. Als Software wurde die MALDI Biotyper Software 2.0<sup>†</sup> verwendet. Dazu wurden Bakterienkolonien direkt auf das MALDI-Target<sup>†</sup> aufgetragen und mit 1 µl Matrixlösung gleichmäßig überschichtet. Das Target wurde bis zum Trocknen der Matrixlösung bei Raumtemperatur aufbewahrt (etwa 5 min). Anschließend wurden die aufgetragenen Proben gemessen und gegen die in der Bruker Datenbank vorhandenen Referenzspektren sowie gegen selbst erstellte Referenzspektren der *Staphylococcus-intermedius*-Gruppe verglichen. Die für die selbst erstellten Referenzspektren genutzten Staphylokokken-Stämme sind in Tabelle III-5 aufgeführt. Vor der Erstellung eines Referenzspektrums erfolgte die Kalibrierung des Microflex LT mittels *E.-coli*-Standard\*. Die Protein-Profile wurden mit einer Laser-Frequenz von 50 Hertz, innerhalb eines Massebereiches von 3000-15000 Dalton sowie mit einem Signal-Rausch-Verhältnis von drei bestimmt. Die Spektren wurden vor Aufnahme in die Datenbank einer Qualitätskontrolle unterzogen. Untypische Spektren wurden aussortiert. Für die Erstellung eines neuen Referenzspektrums wurden mindestens 20 erstellte Spektren des jeweiligen Bakterienstammes genutzt. Score-Werte über 2,000 galten als sichere Genus- und wahrscheinliche Speziesidentifizierung, während Score-Werte über 2,300 für eine sichere Speziesidentifizierung sprachen.

**Tabelle III-5: Ausgewählte Staphylokokken-Stämme für die erstellten Referenzspektren:**

Bezeichnung	Beschreibung
DSM 20771	<i>S. delphini</i>
DSM 20273	<i>S. intermedius</i>
DSM 21284	<i>S. pseudintermedius</i>

#### **2.2.4.3. *pta*-PCR mit anschließender Restriktionsanalyse**

Die Bestätigung der Speziesidentifizierung von *S.-pseudintermedius*-Isolaten erfolgte über den Nachweis des *pta*-Gens mit anschließender Restriktionsanalyse (s. 2.2.6.2. und 2.2.6.5.1.).

#### **2.2.5. Empfindlichkeitsbestimmung der Bakterienstämme**

##### **2.2.5.1. Agardiffusion**

Die Empfindlichkeitsbestimmung der Bakterienisolate gegenüber Antiinfektiva erfolgte zunächst im Agardiffusionsverfahren (WOODS & WASHINGTON, 1995).

Staphylokokkenkolonien wurden in 3 ml physiologische Kochsalzlösung verbracht und auf eine Bakteriendichte von McFarland-Standard 0,5 eingestellt. Anschließend wurden 100 µl dieser Suspension auf Mueller-Hinton-Agarplatten ausgespatelt. Nach Trocknen der Suspension wurden antibiotikahaltige Plättchen (s. Tabelle III-6) aufgebracht und die Platten 30 min bei Raumtemperatur liegen gelassen. Die Agarplatten wurden 18-24 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Der Hemmhofdurchmesser wurde mit einer Schablone ermittelt. Die qualitative Bewertung der Resistenzprofile erfolgte nach den Angaben des CLSI (2008).

**Tabelle III-6: Untersuchte Antibiotika im Agardiffusionsverfahren**

Antibiotikum	Abk.	$\mu\text{g pro Plättchen}$	Intermediär	Resistent
			bei einem Hemmhofdurchmesser von (CLSI, 2008) Angabe in mm	
<b>Amikacin</b>	AK	30	15-16	$\leq 14$
<b>Amoxicillin-Clavulansäure</b>	AUG	20/10	-	$\leq 19$
<b>Ampicillin</b>	AMP	10	-	$\leq 28$
<b>Cefalothin</b>	CL	30	15-17	$\leq 14$
<b>Cefovecin</b>	CVN	30	Kein Grenzwert nach CLSI	
<b>Clindamycin</b>	DA	2	15-20	$\leq 14$
<b>Chloramphenicol</b>	C	30	13-17	$\leq 12$
<b>Doxycyclin</b>	DO	30	15-18	$\leq 14$
<b>Enrofloxacin</b>	ENR	5	17-22	$\leq 16$
<b>Erythromycin</b>	E	15	14-22	$\leq 13$
<b>Gentamicin</b>	CN	10	13-14	$\leq 12$
<b>Imipenem</b>	IPM	10	14-15	$\leq 13$
<b>Marbofloxacin</b>	MAR	5	15-19	$\leq 14$
<b>Mupirocin</b>	MUP	5 und 200	Kein Grenzwert nach CLSI	
<b>Trimethoprim-Sulfonamide</b>	SXT	1,25/23,75	11-15	$\leq 10$

#### 2.2.5.1.1. Bestimmung der Minimalen Hemmkonzentration

Die Bestimmung der MHK von Staphylokokken erfolgte mittels Bouillon-Mikrodilution nach CLSI-Norm M31-A3 (2008).

Die zu untersuchenden Stämme wurden 18-24 h vor der Empfindlichkeitsbestimmung auf BAP ausgestrichen. Eine Bakteriensuspension wurde mit einer Bakterien-Dichte von 0,5 McFarland-Standard in 5 ml physiologischer Kochsalzlösung hergestellt. Ein Teil der Suspension (50  $\mu\text{l}$ ) wurde in 10 ml kationen-adjustierte-Mueller-Hinton-Bouillon (CAMHB) gegeben und gut gemischt (Inokulum). Zur Dichtekontrolle wurden 10  $\mu\text{l}$  des Inokulums entnommen und wiederum mit 10 ml physiologischer Kochsalzlösung gemischt. 100  $\mu\text{l}$  dieser Verdünnung wurden auf BAP ausgespatelt.

Zur Reinheitskontrolle wurden 10  $\mu\text{l}$  des Inokulums im Drei-Ösen-Ausstrich auf BAP ausgestrichen. Das verbliebene Inokulum wurde in eine sterile Wanne gegeben und daraus jeweils 50  $\mu\text{l}$  in eine Kavität der Mikrotiterplatten (Sensititre-Platten<sup>†</sup>) pipettiert. Sowohl die Mikrotiterplatten als auch die BAP zur Dichte- und Reinheitskontrolle wurden 24 h bei 37 °C bebrütet.

Zur Auswertung wurden zunächst die Kolonien der Dichtekontrollplatte ausgezählt. Für die Validität des Tests müssen die Ergebnisse zwischen  $2 \times 10^5$  KBE/ml liegen. Die Kolonien der Reinheitskontrollplatte wurden auf Übereinstimmung mit den zu untersuchenden Bakterien überprüft. Das Bakterienwachstum in den Kavitäten der Mikrotiterplatten wurde notiert und ein MHK-Wert ermittelt. Die qualitative Bewertung der MHK-Werte erfolgte nach CLSI-Norm M31-A3. Zur Kontrolle der Ergebnisse wurde *S. aureus* DSM 2569 genutzt. Die in der Bouillon-Mikrodilution verwendeten Antibiotika sind in Tabelle III-7 aufgeführt.

**Tabelle III-7: Verwendete Antibiotika bei der Empfindlichkeitsbestimmung durch Bouillon-Mikrodilution**

Antibiotika	Abk. <sup>1</sup>	Untersuchte Konz.-stufen <sup>2</sup>	Intermediär	Resistent
			bei einer MHK von (µg/ml)	
<b>Amoxicillin-Clavulansäure</b>	AUG	0,03 – 32	-	≥ 8/4
<b>Cefalothin</b>	CL	0,06 – 64	16	≥ 32
<b>Cefovecin</b>	CVN	0,03 - 16	Kein Grenzwert	
<b>Cefpodoxim</b>	CPD	0,03 – 16	4	≥ 8
<b>Clindamycin</b>	DA	0,03 – 32	1-2	≥ 4
<b>Enrofloxacin</b>	ENR	0,15 -16	1-2	≥ 4
<b>Erythromycin</b>	E	0,015 – 32	1-4	≥ 8
<b>Marbofloxacin</b>	MAR	0.015 – 16	2	≥ 4
<b>Oxacillin</b>	OX	0,03 – 16	-	≥ 4 oder ≥ 0,5 <sup>3</sup>
<b>Trimethoprim-Sulfonamide</b>	SXT	0,06/1,19 – 64/1216	-	≥ 4/76
<b>Vancomycin</b>	V	0,008 - 16	4-8	≥ 16

<sup>1</sup>Abkürzung <sup>2</sup>Untersuchte Konzentrationsstufen <sup>3</sup> MHK-Wert von ≥ 4 bei *S. aureus* und *S. pseudintermedius* oder MHK von ≥ 0,5 für andere *Staphylococcus* spp.

## 2.2.6. Molekularbiologische Untersuchungen

### 2.2.6.1. Gesamtzell-DNA-Isolierung

#### 2.2.6.1.1. Phenol-Chloroform-Extraktion nach Jordens & Hall (1988)

Die Gesamtzell-DNA-Isolierung erfolgte nach einer modifizierten Methode von JORDENS & HALL (1988). Übernachtskulturen der zu untersuchenden Bakterienstämme wurden in einer Zentrifuge<sup>†</sup> bei 3200 x g für 15 min pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet anschließend in 2 ml Tris-EDTA-Natriumchlorid (TES)-Puffer resuspendiert. Die Suspension wurde ein zweites



Mal pelletiert, in 500 µl TES-Puffer resuspendiert und in PHASE-LOCK-Reaktionsgefäße<sup>†</sup> überführt. Zu dem Ansatz wurden 10 µl Lysostaphin-Lösung\* (1800 Einheiten [U] /ml) gegeben und gut gemischt. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei 37 °C (bis zur gewünschten Festigkeit der Suspension) wurden 20 µl einer 10 %igen Natrium-dodecylsulfat- (SDS) Lösung zugegeben und 15 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wurden 530 µl Phenol/Chloroform\* hinzugegeben, die Proteine ausgeschüttelt und 5 min bei 18000 x g zentrifugiert. Dieser Schritt wurde mit der klaren oberen Phase in einem neuen PHASE-LOCK-Reaktionsgefäß<sup>†</sup> wiederholt. Die klare obere Phase wurde wiederum in ein PHASE-LOCK-Reaktionsgefäß überführt und 500 µl Chloroform\*/Isoamylalkohol\* (24:1) zugegeben, gemischt und wiederum 5 min bei 18000 x g zentrifugiert. Über die Zugabe von 500 µl Isopropanol\* zu dem klaren Überstand wurde die DNA ausgefällt. Die DNA wurde durch 30-minütiges Zentrifugieren bei 18000 x g pelletiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet 20 min im Exsikkator getrocknet und in 60 µl Aqua bidest. aufgenommen. Die DNA-Konzentration wurde über ein Spektralphotometer<sup>†</sup> bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Die Lagerung der DNA bei 4 °C war bis zu zwei Wochen möglich.

#### **2.2.6.1.2. DNA-Isolierung mittels DNeasy Blood&Tissue Kit**

Die DNA der Bakterienstämme, welche anschließend über Microarray charakterisiert werden sollten, wurde mittels DNeasy Blood&Tissue Kit isoliert. Übernachtskulturen der zu untersuchenden Bakterienstämme wurden in einer Hochgeschwindigkeitszentrifuge bei 3200 x g für 15 min pelletiert. Der Überstand wurde verworfen. Anschließend erfolgte die Resuspension des Pellets durch Zugabe von 200 µl Lysis Buffer AW1. Diese Suspension wurde zu dem Lysis Enhancer AW2 gegeben und gut gemischt (AW1 und AW2 sind im StaphyType Kit enthalten; s. IX.1). Nach einer 60-minütigen Inkubation bei 37 °C wurden 25 µl Proteinase K hinzugegeben, gut gemischt und 30-60 min bei 550 rpm im Thermomixer<sup>†</sup> inkubiert. Nach der Zugabe von 200 µl Ethanol\* (96 %) und guter Durchmischung wurde die Suspension in die Säule eines „Collection tube“ pipettiert und 1 min bei 6800 x g zentrifugiert. Die Säule wurde in ein neues „Collection tube“ überführt und nach Zugabe von 500 µl Buffer AW1 wiederum 1 min bei 6800 x g zentrifugiert. Dieser Schritt wurde mit 500 µl Buffer AW2 und anschließender Zentrifugation über 3 min bei 20000 x g wiederholt. Weiterhin

wurde die Säule in ein normales 1,8 ml Eppendorf-tube<sup>†</sup> gegeben und 50 µl Wasser direkt in die Mitte der Säule gegeben. Die Säule mit dem überschichteten Wasser wurde 1 min bei Raumtemperatur stehen gelassen und anschließend 1 min bei 6800 x g zentrifugiert. Die DNA-Konzentration wurde über ein Spektralphotometer bestimmt. Die Abwesenheit von RNA wurde durch Gelelektrophorese und durch die Konzentrationsbestimmung im Photometer bei einer Wellenlänge von 260 nm überprüft. Die Lagerung der DNA bei 4 °C war bis zu 2 Wochen möglich.

#### 2.2.6.2. Polymerase-Kettenreaktion

Bei der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) handelt es sich um eine Methode, bei der ein definierter Teil eines DNA-Strangs gezielt vervielfältigt wird. Die Vervielfältigung erfolgt in drei Schritten. Zunächst wird bei der Denaturierung die DNA bei Temperaturen von 94-96 °C in ihre Einzelstränge getrennt. Die anschließende Primer-Hybridisierung an die DNA wird als Annealing bezeichnet. Die spezifische Anlagerung der Primer an die DNA wird durch die bei diesem Schritt genutzte Temperatur beeinflusst. In der folgenden Elongationsphase wird mit Hilfe der DNA-Polymerase der komplementäre Strang zum Einzelstrang hergestellt. Ausgangspunkt sind die angelagerten Primer.

Dieser Zyklus wird, entsprechend den unten aufgeführten PCR-Protokollen, mehrfach wiederholt, um eine entsprechende Menge des zu amplifizierenden DNA-Abschnittes zu erhalten. Zur Absicherung des PCR-Prozesses wurden bei jedem durchgeführten Versuch eine Positiv- und eine Negativkontrolle mitgeführt.

Für den Nachweis der Gene *mecA*, *pta*, *spa* und der 16S rRNA wurde folgender Reaktionsansatz genutzt:

##### 50 µl Ansatz:

1 µl	DNA (50 ng/µl)
1 µl	von jedem Primer (20 pmol; s. Tabelle III-3)
3 µl	<u>dNTP-Mix</u> (2 mM)
5 µl	10x Puffer mit 500 mM KCl und 15 mM MgCl <sub>2</sub>
0,5 µl	<i>Taq</i> DNA-Polymerase*
38,5 µl	Aqua bidest.

Folgende PCR-Protokolle wurden mit dem Thermocycler<sup>†</sup> genutzt:

Nachweis des *mecA*-Gens:

3 min 95 °C	
30 sec 95 °C	30 Zyklen
30 sec 55 °C	
30 sec 72 °C	
4 min 72 °C	
Auf 4 °C abkühlen	

Nachweis des *pta*-Gens:

2 min 95 °C	
1 min 95 °C	30 Zyklen
1 min 53 °C	
1 min 72 °C	
7 min 72 °C	
Auf 4 °C abkühlen	

Nachweis des *spa*-Gens für *S. pseudintermedius*:

3 min 95 °C	
30 sec 95 °C	30 Zyklen
45 sec 58 °C	
1 min 72 °C	
10 min 72 °C	
Auf 4 °C abkühlen	

Nachweis des *spa*-Gens für *S. aureus*:

5 min 95 °C	
45 sec 95 °C	35 Zyklen
45 sec 60 °C	
90 sec 72 °C	
10 min 72 °C	
Auf 4 °C abkühlen	

Nachweis des 16S rRNA-Gens:

3 min 95 °C	
30 sec 95 °C	30 Zyklen
30 sec 57 °C	
1 min 72 °C	
7 min 72 °C	
Auf 4 °C abkühlen	

Die erhaltenen Amplifikate wurden durch Agarose-Gelelektrophorese (s. 2.2.6.6.) dargestellt.

### 2.2.6.3. Lineare Multiplex-PCR

Bei der Multiplex-PCR handelt es sich um eine Modifikation der eigentlichen PCR, bei der mehr als ein Primerpaar genutzt wird. Bei dieser Methode werden Amplifikate von verschiedener Größe produziert, welche spezifisch für verschiedene DNA-Sequenzen sind. Diese Methode ist zeitsparend, da mit der einfachen PCR-Methode für das gleiche Ergebnis mehrere PCR-Ansätze notwendig wären. Bei zusätzlicher linearer Amplifikation wird nur eine Seite des DNA-Doppelstranges amplifiziert, während die DNA-Amplifikate nicht kopiert werden. Es entsteht ein hoher Anteil einzelner DNA-Stränge (SANCHEZ et al., 2004).

Die in dieser Studie genutzte lineare Multiplex-PCR für die anschließende Charakterisierung der Staphylokokken-Stämme mittels Microarray (s. 2.2.6.7.) enthielt über 330 Primer für verschiedene Sequenzen entlang des Genoms. Die für

diese PCR verwendeten Reagenzien waren im StaphyType-Kit enthalten. Folgender Reaktionsansatz wurde für die Durchführung der linearen Multiplex-PCR genutzt:

10 µl Ansatz:

5 µl	DNA (300 ng/µl)
4,9 µl	B1 (2x Labelling Buffer mit Biotin-markierten Nukleotiden; s. IX.2. StaphyType-Kit)
0,1 µl	B2 (DNA-Polymerase; s. IX.2. StaphyType-Kit)

PCR-Protokoll

5 min 96 °C	
20 sec 50 °C	40 Zyklen
30 sec 72 °C	
20 sec 96 °C	
Auf 4 °C abkühlen	

**2.2.6.4. Aufreinigung und Quantifizierung von PCR-Amplifikaten**

Die Aufreinigung der PCR-Amplifikate aus 2.2.6.2 erfolgte mittels „illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit“. Der Capture Puffer Typ 3 wurde zum PCR-Produkt der Probe hinzugegeben und gut gemischt. Die PCR-Puffer-Mischung wurde in die Säule eines „Collection tube“ gegeben und anschließend bei 20000 x g 30 sec zentrifugiert. Anschließend wurden 500 µl Waschpuffer Typ 1 in die Säule gegeben und wiederum 30 sec bei 20000 x g zentrifugiert. Die Säule wurde in ein normales 1,8 ml Eppendorf-tube überführt und 50 µl Elutionspuffer Typ 6 direkt in die Mitte der Säule gegeben. Die überschichtete Säule wurde 1 min bei Raumtemperatur stehen gelassen und anschließend 30 sec bei 20000 x g zentrifugiert. Die DNA-Konzentration wurde über ein Spektralphotometer gemessen. Das gereinigte PCR-Produkt wurde anschließend in einem Gesamtvolumen von 15 µl auf eine Konzentration von 2 ng/µl eingestellt.

### 2.2.6.5. Restriktionsanalysen

Restriktionsanalysen werden unter anderem für Untersuchungen von Genen genutzt. Unter Einsatz von spezifischen Restriktionsendonukleasen wird die DNA in Fragmente definierter Größe gespalten. Die Auftrennung der entstandenen DNA-Fragmente nach ihrer Größe erfolgt mittels Gelelektrophorese.

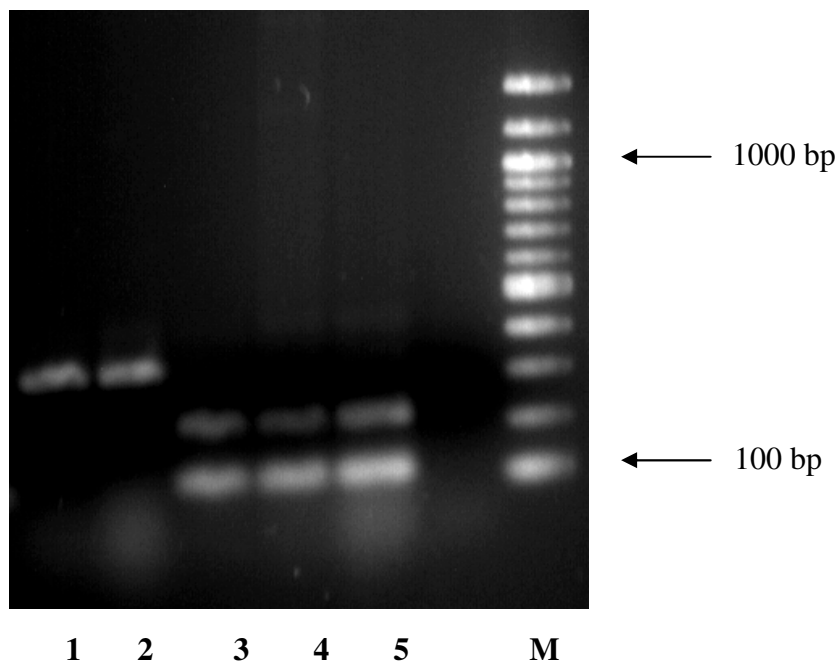
#### 2.2.6.5.1. Restriktionsanalyse mit *MboI*

Das PCR-Produkt des *pta*-Gens (s. 4.1.3. und 2.2.6.2.) wurde für die Speziesidentifizierung von *S. pseudintermedius* mit Hilfe von *MboI* enzymatisch geschnitten. Bei Vorliegen der *MboI*-Restriktionsstelle, welche spezifisch für *S. pseudintermedius* ist, wird das *pta*-Produkt (320 bp) in zwei Fragmente von 213 bp und 107 bp geschnitten (s. Abb. III-1).

#### 15 µl-Ansatz des Restriktionsverdaus:

10 µl	PCR-Produkt: Konzentration 2 ng/µl
1,5 µl	10x Puffer R*
1 µl	<i>MboI</i> *
2,5 µl	Aqua bidest

Der Restriktionsverdau wurde 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Auswertung mittels Agarose-Gelelektrophorese (s. 2.2.6.6. und Abb. III-1).



**Abb. III-1: Geschnittene und ungeschnittene *pta*-Produkte der SIG**

M= Marker (100 bp DNA-Ladder\*); 1 = *S. intermedius*; 2 = *S. delphini*; 3-5 = *S.-pseudintermedius*-Isolate aus klinischen Fällen.

#### 2.2.6.5.2. Makrorestriktion mit anschließender Pulsfeld-Gelelektrophorese

##### Anzucht, Lyse und Proteinase-Verdau

Die Bakterien-Stämme wurden in 8 ml BHI-Medium über Nacht im Schüttelinkubator<sup>†</sup> (120 rpm) bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Dichte der Bakteriensuspension im Uvikon<sub>XS</sub>- Photometer<sup>†</sup> bei 578 nm gemessen. Die optische Dichte sollte 0,3 betragen und musste gegebenenfalls über eine entsprechende Verdünnung eingestellt werden. Anschließend wurde die Bakteriensuspension (5 ml) bei 4 °C und 3200 x g über 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgekippt und das verbliebene Pellet in 5 ml kaltem Pett-IV-Puffer resuspendiert, gut gemischt und wiederum bei 4 °C und 3200 x g über 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgekippt und das Pellet in 500 µl kaltem Pett-IV-Puffer resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde mit 500 µl einer vorher erhitzten 1,2 % Chromosomal Grade Agarose\* (Verwendung bei 56 °C) gemischt, in Gießförmchen<sup>†</sup> pipettiert und für mindestens 10 min bei 4 °C gekühlt. Die entstandenen Agaroseblöckchen wurden in 3 ml Lyselösung gegeben und 2 h bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurde die Lyselösung abgekippt, je 3 ml ESP-Lösung hinzugegeben und über Nacht bei 56 °C inkubiert.

### Waschschritte

Nach Abkippen des ESP-Puffers wurden 3 ml Aqua bidest. hinzugegeben und 15 min bei Raumtemperatur geschwenkt. Nach dem Abkippen des Aqua bidest. wurden je 2 ml eines TE-PMSF-Puffers zu den Agaroseblöckchen gegeben und 30 min bei Raumtemperatur geschwenkt. Dieser Waschschritt wurde einmal wiederholt. Anschließend wurden wiederum 3 ml Aqua bidest. zu den Agaroseblöckchen gegeben und 15 min bei Raumtemperatur geschwenkt. Nach dem Abkippen des Aqua bidest. wurden je 3 ml TE-Puffer (10:1) zugegeben und 30 min bei Raumtemperatur geschwenkt. Dieser Waschschritt wurde zweimal wiederholt, wobei beim letzten Waschschritt 5 ml TE-Puffer (10:1) hinzugegeben wurden und mit den Agaroseblöckchen über Nacht bei 4 °C gekühlt wurde.

### Restriktionsverdau

Von den über Nacht gelagerten Agaroseblöckchen wurden 2 Gelstücke in der Größe der später genutzten Geltaschen abgeschnitten, in den Äquilibrierungspuffer überführt und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen wurde eine Enzymlösung für den Restriktionsverdau hergestellt.

#### 50 µl Ansatz für den Restriktionsverdau:

5 µl	10x Puffer
2 µl	<i>Sma</i> I
43 µl	Aqua bidest.

Nach dem Entfernen des Äquilibrierungspuffers wurden 50 µl der Enzymlösung zu den Gelstücken gegeben und 4 h bei 25 °C inkubiert.

### Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE)

Die Gelstücke wurden in die Geltaschen eines vorher gegossenen 1%igen Gels (Sea Kem GTG Agarose\* mit 110 ml 0,5x TBE-Puffer) überführt und mit auf mindestens 56 °C erwärmter Chromosomal Grade Agarose versiegelt. Das Gel wird nach der Aushärtung in die PFGE-Kammer überführt, welche vorher mit 2,2 l 0,5x TBE-Puffer befüllt wurde.



Programm der PFGE:**BLOCK 1**

Initial switch time	7 sec
Final switch time	12 sec
Run time	10 h

**BLOCK 2**

Initial switch time	20 sec
Final switch time	40 sec
Run time	12 h

5,5 Volts/cm

Included angle 120 °

Nach Ablauf des PFGE-Programm wurde das Gel im GelRed\*-Bad über 30 min angefärbt und anschließend photographiert.

**2.2.6.6. Agarose-Gelelektrophorese**

Bei der Gelelektrophorese werden DNA-Fragmente nach ihrer Größe aufgetrennt und entsprechend mit DNA-Fragmenten bekannter Größe (Größenstandard) verglichen. Dabei wandern die negativ geladenen DNA-Fragmente zur Kathode, wobei kleinere Fragmente schneller durch das Gel wandern.

Die Methode eignet sich für die Darstellung von DNA aus DNA-Isolierungen, PCR-Produkten sowie Restriktionsfragmenten. Folgendes Agarose-Gelelektrophorese-Protokoll wurde in dieser Studie genutzt:

Als Laufpuffer in den Gelkammern (Größe 15 x 15 cm) diente Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer (1x). Von den PCR-Amplifikaten und DNA-Fragmenten nach der Restriktion wurden 10 µl mit 4 µl Blaumarker\* zur Beschwerung der Probe und Sichtbarmachung des Probenlaufs gemischt. Diese Mischung wurde anschließend in die Geltaschen einer 1%igen Agarose pipettiert. Als Größenstandard diente der 100 bp DNA-Ladder. Über den Stromgeber<sup>†</sup> wurden zunächst 80 V und später nach dem Herauswandern der Proben 120 V angelegt. Zur Sichtbarmachung der DNA-Fragmente wurde ein GelRed-Bad genutzt, in dem die Agarose-Gele für 30 min eingelegt wurden. Anschließend wurden die Agarose-Gele photographiert.

### 2.2.6.7. Microarray

Für Staphylokokken sind bisher Microarray-basierte Versuchssysteme für die Genotypisierung von *S.-aureus*-Stämmen verfügbar. In der vorliegenden Studie wurde das StaphyType™ Kit genutzt. Alle weiter unten sowie in den Abschnitten 2.2.6.1.2. und 2.2.6.3. aufgeführten Substanzen sind in diesem Kit enthalten. Auf der Array-Chip-Oberfläche befinden sich organismenspezifische Sonden, welche über 300 genetische Marker darstellen. Das Target-Set besteht aus verschiedenen Spezies-Markern, Toxin, Virulenzgenen und Antibiotika-Resistenzgenen. Die DNA-Chips mit ihren verschiedenen Spots (Sonden) befinden sich in Array-Strips mit jeweils acht „wells“ für die Analyse von acht klinischen Proben (s. Abb. III-2). Über die Hybridisierung binden biotin-markierte einzelsträngige DNA-Sequenzen (s. 2.2.6.3.) an ihren komplementären Gegenstrang (Sonde) auf der Array-Oberfläche. Ungebundene DNA-Moleküle werden ausgewaschen. Danach erfolgt die Zugabe von Streptavidin-Horseradish(Meerrettich)-Peroxidase. Das Biotin innerhalb der DNA bindet an das Streptavidin, welches wiederum an die Meerrettich-Peroxidase gekoppelt ist. Über das Substrat der Meerrettich-Peroxidase erfolgt dann die eigentliche Färbung der gebundenen DNA.



**Abb. III-2: Darstellung eines Array-Strips mit den darin enthaltenen DNA-Chips (Alere GmbH, Köln)**

### Protokoll für die Hybridisierung und Datenerfassung im ArrayMate Reader<sup>†</sup>

#### **Herstellung der Hybridisierungsmischung**

Zu jedem PCR-Produkt (10 µl; s. 2.2.6.3.) wurden 90 µl Puffer C1 gegeben und vorsichtig gemischt.

#### **Waschschritte**

Aqua dest. (200 µl) wurde auf jedes well des ArrayStrip gegeben, vorsichtig

gemischt und anschließend wieder entfernt. Der Puffer C1 (200 µl) wurde in jede Vertiefung gegeben und 2 min bei 55 °C und 550 rpm im Thermomixer inkubiert. Danach wurde der Puffer C1 wieder entfernt und sofort mit der Hybridisierung fortgefahren, um ein Austrocknen der Chip-Oberfläche zu verhindern.

### **Hybridisierung**

Jede Hybridisierungsmischung (100 µl) wurde in ein vorbereitetes well gegeben und eine Stunde bei 55 °C und 550 rpm inkubiert.

### **Waschschritte nach der Hybridisierung**

Die Hybridisierungsmischung wurde möglichst vollständig entfernt und in jedes well 200 µl Puffer C2 pipettiert, vorsichtig gemischt und der Puffer wieder entfernt. Dieser Waschschritt wurde zweimal wiederholt.

### **Zugabe des Streptavidin-Horseradish-Peroxidase (HRP)-Konjugates**

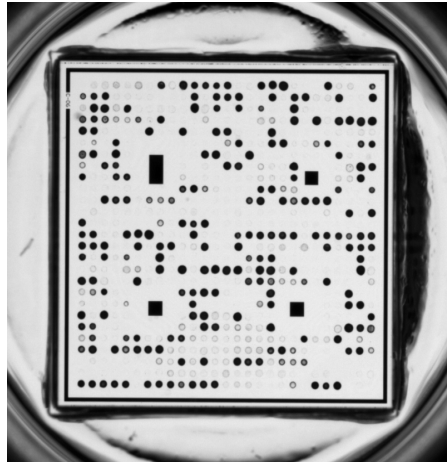
Reagent C3 (HRP) und Puffer C4 wurden im Verhältnis 1:100 gemischt. Von dieser Mischung wurden 100 µl in jedes well verbraucht und 10 min bei 30 °C und 550 rpm im Thermomixer inkubiert. Nachfolgend wurde das C3/C4-Gemisch wieder entfernt und 200 µl Puffer C5 in jedes well gegeben, vorsichtig gemischt und wieder entfernt. Dieser Waschschritt wurde einmal wiederholt.

### **Färbung des gebundenen HRP-Konjugates**

In jedes well wurden 100 µl Reagent D1 (Substrat für HRP) gegeben und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert.

### **Datenerfassung im ArrayMate Reader**

Die Datenerfassung erfolgte im ArrayMate Reader. Die Auswertung der einzelnen gefärbten oder nicht gefärbten Spots wurde in einem Daten-Bericht dargestellt (s. Abb. III-3 und III-4).



**Abb. III-3: DNA-Chip mit positiven und negativen Spots**

StaphyType Test Report (2nd Page)

Operator	Horstmann
Sample ID	1015_1
Experiment ID	1015_1 - {86D5BBE4-F4A5-4183-BC8B-F1FD3418A298}
Date of Result	Wed Aug 11 14:39:37 2010
Assay Name	StaphyType
Assay ID	10248
Well Position	02 (01-B)
Software Version	2009-07-09
Device	03a0025
Data Quality	passed

Genetic markers for S. aureus / MRSA / PVL

Taxonomy	
Species Marker (S.aureus)	positive
MRSA (mecA)	positive
PVL	negative

Species Markers / Regulatory Genes

Gene/Probe	Result	Explanation
23S-rRNA	positive	23S-rRNA Gene
gapA	positive	Glyceraldehyde 3-phosphate Dehydrogenase
katA	positive	Catalase
coA	positive	Coagulase
		Staphylococcus Protein
Protein A	positive	A
sbi	positive	IgG-binding protein
nuc	positive	Thermostable Nuclease (DNAse)
fnbA	positive	Fibronectin-binding Protein A
vraS	positive	vraS Sensor Protein
sarA	positive	Staphylococcal Accessory Regulator A
eno	positive	Enolase, Phosphopyruvate Hydratase
saeS	positive	Histidine Protein Kinase (sae Locus)

**Abb. III-4: Ausschnitt eines Daten-Berichtes der *S. aureus*-Genotypisierung**

Die im Daten-Bericht aufgeführten Spezies-Marker sind spezifisch für *S. aureus*. Daher musste für die Auswertung von *S.-pseudintermedius*-Isolaten und KNS eine Rohdatenanalyse erfolgen. Die erfassten Rohdaten wurden in eine Excel-Applikation, welche für die Qualitätskontrolle genutzt wird, eingefügt und ausgewertet. Die Excel-Applikation wurde von der Alere GmbH (Köln) für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

#### 2.2.6.8. Sequenzierungen

Für die Sequenzierung des 16S-rRNA-Gens und des *spa*-Gens wurden die entsprechenden PCR-Produkte aufgereinigt und quantifiziert (s. 2.2.6.4.). Das PCR-Produkt wurde zusammen mit dem jeweiligen Primer (Konzentration 2 pmol/µl) für die Sequenzierung an Eurofins MWG Operon (Ebersberg) verschickt. Die Sequenzierung erfolgte mit Hilfe der Cycle Sequencing Technologie auf Applied Biosystems 3730xl DNA Analyzer (Darmstadt). Die Datenauswertung der erhaltenen Sequenzen für das *spa*-Gen wurde für *S. pseudintermedius* mit Hilfe der angegebenen *spa*-Typen von MOODLEY et al. (2009) durchgeführt. Die Analyse der *spa*-Sequenzen von *S. aureus* erfolgte mit dem Ridom Spa Server ([www.spaserver.ridom.de](http://www.spaserver.ridom.de)).

Die Auswertung der 16S rRNA-Sequenzen erfolgte über den „Basic Local Alignment Search Tool“ (BLAST; [www.ncbi.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nih.gov/BLAST/)).

## IV. ERGEBNISSE

### 1. Vorstudie Selektivmedien

#### 1.1. Ergebnisse der untersuchten Selektivmedien

Staphylokokken-Stämme ohne das *mecA*-Gen wuchsen auf keinem der untersuchten Agars. Die untersuchten MRSA-Stämme wiesen eine typische MRSA-Koloniemorphologie auf, welche sich mit den Angaben des jeweiligen Herstellers deckte (s. Tabelle IV-1). Für MRSP konnte ein gutes Wachstum, basierend auf der Koloniemorphologie und der semiquantitativen Bakterienmenge, auf allen Selektivmedien außer CHROMagar und chromID beobachtet werden. Auf den CHROMagar- und chromID-Platten konnte ein wesentlich geringeres und verzögertes Wachstum beobachtet werden. Eine Übersicht über die Koloniefarben, die Koloniegrößen und die Bakterienmenge gibt Tabelle IV-1. Beim Vergleich der verschiedenen Staphylokokken-Isolate innerhalb einer Spezies konnten keine größeren Unterschiede festgestellt werden und auch die Doppelansätze der durchgeführten Versuche zeigten fast identische Resultate in Größe, Quantität und Farbe der Kolonien.

MRSP konnte auf MSA, ORSAB und Brilliance aufgrund seiner Koloniegröße und -farbe von MRSA unterschieden werden (s. Tabelle IV-1). *S. sciuri* besitzt häufig ein funktionelles *mecA*-Gen und kann daher auf den Selektivplatten wachsen. *S. sciuri* mit *mecA*-Gen hatte annähernd die gleiche Koloniefarbe wie MRSP auf CHROMagar, chromID und Brilliance, während auf den MSA und ORSAB-Selektivplatten eine größere Ähnlichkeit zu MRSA festgestellt werden konnte. MRSH-Stämme wuchsen als hellblaue Kolonien auf ORSAB und konnten daher mit MRSP-Stämmen verwechselt werden (s. Tabelle IV-1). Enterokokken wuchsen nicht auf MSA und ORSAB, während kleine Kolonien (0,2 – 0,5 mm Durchmesser) auf den anderen Selektivmedien beobachtet werden konnten. *Ps. aeruginosa* und *E. coli* wuchsen auf keinem Selektivmedium. *Pr. mirabilis* zeigte ein gutes bis moderates Wachstum auf allen Selektivplatten außer Brilliance. Das für *Pr. mirabilis* bekannte Schwärmphänomen konnte allerdings nicht beobachtet werden. *K. pneumoniae* konnte nach 24 h Inkubation nicht nachgewiesen werden, jedoch konnten nach 48 h gelbe Kolonien (0,5 mm Durchmesser) auf MSA und graue Kolonien (0,5 mm Durchmesser) auf Brilliance detektiert werden.

## 1.2. Ergebnisse der Mischungsversuche

Die Resultate der Mischungsversuche sind in Tabelle IV-2 dargestellt. Generell wurden, wie bei den Einzelversuchen, weniger MRSP Kolonien auf CHROMagar und chromID beobachtet, wobei auf diesen Selektivmedien auch die Unterscheidung zwischen MRSA und MRSP schwierig war. Aus diesem Grund wurden für die weiteren Versuche nur MSA, ORSAB und Brilliance genutzt. MRSP und MRSA konnten aufgrund der unterschiedlichen Koloniefarbe und -größe gut auf Brilliance und ORSAB differenziert werden. Auf MSA war ebenfalls eine Differenzierung zwischen MRSP und MRSA möglich, aber diffiziler aufgrund der ähnlichen Koloniefarbe und -größe (s. Tabelle IV-1 und IV-2). Vor allem bei einer Inkubationstemperatur von 34 °C (empfohlene Temperatur des Herstellers) war die Koloniegröße von MRSA und MRSP identisch. MRSP konnte auf MSA, Brilliance und ORSAB auch dann identifiziert werden, wenn im Verhältnis 1:9 mit MRSA gemischt wurde. Ebenso wurde die Detektion von MRSP durch die Zugabe von MSSP (Verhältnis 1:1) nicht gestört.

*S. sciuri* mit funktionellem *mecA*-Gen konnte von MRSA auf MSA und ORSAB unterschieden werden aufgrund seiner Koloniegröße nach 24 h und zusätzlich auf ORSAB aufgrund seiner Koloniefarbe nach 48 h. Die Differenzierung zwischen *S. sciuri* und MRSP auf Brilliance war durch die ähnliche beige bis hellblaue Koloniefarbe schwierig. *K. pneumoniae* und *Pr. mirabilis* konnten in Mischkulturen auf allen drei Selektivmedien von MRSP und MRSA unterschieden werden (s. Tabelle IV-2).

## 1.3. Ergebnisse des quantitativen Bakteriennachweises

Die Ergebnisse der Koloniezählung von MRSP auf BAP, MSA, ORSAB und Brilliance waren sehr ähnlich (Mittelwert 27 Kolonien bei einer Verdünnung von 1:100 000). Auf CHROMagar wuchs MRSP nach 24 h mit sehr kleinen weißen Kolonien (0,1 mm Durchmesser), welche schwierig zu erkennen waren. Bis zu einer Inkubationszeit von 48 h konnten keine Kolonien bei acht von zehn MRSP-Stämmen auf dem chromID-Selektivmedium beobachtet werden. Daher wurde für den chromID-Selektivagar ein zusätzlicher Versuchsansatz durchgeführt, bei dem alle Verdünnungsstufen auf die Platten verbracht wurden (s. III.2.1.3.). Acht von zehn MRSP-Stämmen konnten erst bei einer Verdünnungsstufe von 1:1000 nachgewiesen werden (Mittelwert 42 Kolonien mit variabler Größe).



**Tabelle IV-1:** Wachstum der *mecA*-positiven Staphylokokken Stämme auf MRSA Screening Agar (Analyse nach 24 h Inkubation bei 37 °C)

Spezies	MSA			CHROMagar			chromID			ORSAB			Brilliance		
	Kolonie-Farbe <sup>a</sup>	Kolonie-Größe (mm)	Menge <sup>b</sup>	Kolonie-Farbe	Kolonie-Größe (mm)	Menge	Kolonie-Farbe	Kolonie-Größe (mm)	Menge	Kolonie-Farbe	Kolonie-Größe (mm)	Menge	Kolonie-Farbe	Kolonie-Größe (mm)	Menge
MRSP	rosa-gelb	1.0	+++	helllila	0.5-1.0	++	grün	0.5-1.0	+ - ++	weiß-hellblau	1.0	+++	hellblau	0.5	+++
MRSA	gelb	0.5	+++	lila	1.0	+++	grün	1.5	+++	blau	0.5	+++	blau	0.5	+++
MRSE	weiß-rosa	0.2	+++	weiß	0.2	+++	weiß	0.2	+++	weiß	0.2	+++	weiß-hellblau	0.2	+++
MRSH	rosa-gelb	0.7	+++	weis	1.5	+++	weiß	1.0	+++	weiß-hellblau	1.0	+++	weiß	1.5	+++
<i>S. sciuri</i>	gelb	0.3	++	grün-lila	1.0	+++	grün	1.0	+++	blau	0.5	+++	hellblau	1.0	+++

<sup>a</sup> Farbe der Einzelkolonien<sup>b</sup> Koloniezahl in der semiquantitativen Analyse des Drei-Ösen-Ausstriches: +++ = gutes Wachstum, ++ = moderates Wachstum, + = geringes Wachstum

**Tabelle IV-2:** Wachstum von MRSP in Mischkulturen mit verschiedenen anderen Bakterien auf MRSA Screening Agars (Analyse nach 24 h Inkubation bei 37 °C)

Spezies	Verhältnis	MSA			CHROMagar			chromID			ORSAB			Brilliance		
		Kolonie Farbe <sup>a</sup>	Kolonie Größe (mm)	Menge <sup>b</sup>	Kolonie Farbe	Kolonie Größe (mm)	Menge	Kolonie Farbe	Kolonie Größe (mm)	Menge	Kolonie Farbe	Kolonie Größe (mm)	Menge	Kolonie Farbe	Kolonie Größe (mm)	Menge
MRSP	1:1	gelb	0.7	++	Keine Identifizierung			Keine Identifizierung			hellblau	1.0	+++	hellblau	0.5	+++
MRSA		gelb	0.3	++	lila	1.0	+++	grün	1.5	+++	blau	0.5	+++	blau	0.5	+++
MRSP	1:9	gelb	1.0	+++	n.t. <sup>c</sup>			n.t.			hellblau	1.0	+++	hellblau	0.5	+++
MRSA		gelb	0.5	+++							blau	0.5	+++	blau	0.5	+++
MRSP	9:1	gelb	1.0	+++	n.t.			n.t.			hellblau	1.0	+++	hellblau	0.5	+++
MRSA		gelb	0.5	+++							blau	0.5	+++	blau	0.5	+++
MRSP	1:9	rosa-gelb	1.0	++	helllila	0.2	+ - ++	grün	0.5	+	hellblau	1.0	+++	hellblau	0.5	+++
MSSP		-			-			-			-			-		
MRSA	1:9	gelb	0.5	++	lila	1.0	++	grün	1.5	+++	blau	0.5	+++	blau	0.5	+++
MSSP		-			-			-			-			-		
MRSP	1:1	rosa-gelb	1.0	+++	n.t.			n.t.			hellblau	1.0	+++	hellblau	0.5	+++
<i>S. sciuri</i>		gelb	0.2	++							hellblau <sup>d</sup>	0.5	+++	beige <sup>e</sup>	0.5	+++
MRSA	1:1	gelb	0.5	+++	n.t.			n.t.			blau	0.5	+++	blau	0.5	+++
<i>S. sciuri</i>		gelb	0.2	+++							Differenzierung nicht möglich			hellblau	0.5	+++
MRSP	1:1	rosa-gelb	1.0	+++	n.t.			n.t.			hellblau	1.0	+++	hellblau	0.5	+++
<i>Pr. mirabilis</i>		gelb	0.2	+++							weiß	0.1	++	grau	0.2	++
MRSA	1:1	gelb	0.5	++	n.t.			n.t.			blau	0.5	+++	blau	0.5	+++
<i>Pr. mirabilis</i>		gelb	0.2	+							weiß	0.2	+++	grau	0.2	++
MRSP	1:1	rosa-gelb	1.0	+++	n.t.			n.t.			hellblau	1.0	+++	hellbau	0.5	++
<i>K. pneumoniae</i>		-									-			-	0.2	++
MRSA	1:1	gelb	0.5	+++	n.t.			n.t.			blau	0.5	+++	blau	0.5	+++
<i>K. pneumoniae</i>		-									-			-		

<sup>a</sup> Farbe der Einzelkolonien

<sup>b</sup> Bakterienmenge in der semiquantitativen Analyse des Drei-Ösen-Ausstriches: +++ = gutes Wachstum, ++ = moderates Wachstum, + = geringes Wachstum

<sup>c</sup> n.t. = nicht untersucht

<sup>d</sup> nach 48 h blaue Kolonien erkennbar

## 2. Hauptstudie

### 2.1. Probensammlung sowie Auswertung der Hunde- und Besitzerdaten

Von den 27 beprobten Hunden konnten bei 17 Hunden (63 %) multiresistente Staphylokokken nachgewiesen werden. Die für das Screening auf multiresistente Staphylokokken negativen Proben enthielten überwiegend MSSP, Enterokokken, *Pr. mirabilis* u.a. Die Tabelle IV-3 gibt einen Überblick über die negativen Probenergebnisse.

Die in die Studie aufgenommenen Patienten mit multiresistenten Staphylokokken wiesen unterschiedliche Rassen und ein Alter von 4 Monaten bis zu 13 Jahren auf (s. Tabelle IV-4). Es handelte sich um zwölf männliche und fünf weibliche Hunde mit unterschiedlichen Vorberichten von lokalisierten Entzündungen wie *Otitis externa* oder generalisierten Hautinfektionen mit Krusten- und Pustelbildung (s. Tabelle IV-4). Alle Patienten waren mit mindestens einem Antibiotikum vorbehandelt. Die Antibiotika-Gabe erstreckte sich über einen Zeitraum von 1 bis 7 Wochen. Am Tag der Tupfer-Probenentnahme konnten bei jedem Hund zytologisch Kokken nachgewiesen werden. Die Ursachen der Haut- oder Ohrinfektionen reichten von Umweltallergien über Demodikose bis zu Autoimmunerkrankungen wie *Erythema multiforme*. Bei einem Teil der Patienten konnte die Ursache der Haut- oder Ohrinfektion nicht abschließend geklärt werden (s. Tabelle IV-4). Alle Hunde wurden im Haus gehalten und hatten engen Kontakt zu ihrem Besitzer. Bei zehn der 17 Hundebesitzer (59 %) durfte der Hund mit auf dem Sofa oder Bett liegen und sechs der 17 Hunde (35 %) leckten ihren Besitzern regelmäßig über das Gesicht.

**Tabelle IV-3: Negative Probenergebnisse**

Proben-Nr.	Ergebnis Läsion Routinediagnostik <sup>1</sup>	Ergebnis Läsion ORSAB	Tupfer-entnahmestelle
174	<i>S. pseudintermedius</i>	negativ	Thorax
1488	<i>Moraxella canis</i> <i>Enterococcus</i> sp. Coryneforme Stäbchen	negativ	Pfote
1908	<i>S. pseudintermedius</i>	negativ	Inguinal
1971	<i>S. pseudintermedius</i> Enterobakterien	negativ	Tarsalgelenk
3641	<i>S. pseudintermedius</i>	negativ	Inguinal
3829	o.B. <sup>2</sup>	negativ	Pfote
4022	<i>S. pseudintermedius</i> <i>Citrobacter koseri</i>		Thorax
4178	Aerobe hämolysierende Sporenbildner <i>Enterococcus faecalis</i> diverse Corynebakterien	<i>Enterococcus faecalis</i> diverse Corynebakterien	Ohr
4258	Aerobe hämolysierende Sporenbildner Diverse Mikrokokken <i>Acinetobacter</i> sp.	negativ	Hals
4497	<i>Pr. mirabilis</i>	<i>Pr. mirabilis</i>	Pfote

<sup>1</sup> Anzucht auf BAP, Colistin-Nalidixinsäure-Platten und Rambach-/Gassner-Platten

<sup>2</sup> o. B. = ohne Befund

**Tabelle IV-4: Hunde mit multiresistenten Staphylokokken**

Nr.	Alter <sup>1</sup> und ♀/♂ <sup>2</sup>	Rasse	Vorbericht	systemische Antibiotika- Behandlung während der letzten drei Monate	Ursache
115	6 wk	Mischling	Entzündung der Vulvafalte	Cefalexin (CF)	Anatomische Gegebenheiten
126	3 m nk	Akita Inu	Generalisierte Pusteln und Krusten	AUG, CF	Demodikose
279	12 m nk	DSH <sup>3</sup>	Ohrentzündung	ENR	Umweltallergie
735	5 m nk	Franz. Bulldogge	Ohrentzündung	CF, ENR	Nicht bekannt
818	13 wk	Cocker Spaniel	Ohrentzündung	AUG	Nicht bekannt
876	4 Mon m	Bolonka Zwetna	Krusten im Bereich des Rückens	DA, CF	Juvenile Cellulitis <sup>4</sup>
1015	3 wk	Franz. Bulldogge	Erosionen im Gesicht	CF	Umweltallergie
1136	8 wk	Mischling	Ohrentzündung	DA, ENR, MAR	Umweltallergie
1850	13 m nk	Bullterrier	Knoten und Ulzera an den Pfoten	CF	Umweltallergie und Mastzelltumor
3164	3 m nk	Labrador	Knoten an den Pfoten	CF	Futter- oder Umweltallergie
3674	5 mk	Rhodesian Ridgeback	Generalisierte Ulzera	AUG, DA, ENR, Metronidazol	Erythema multiforme
3734	7 wk	WHWT <sup>5</sup>	Entzündung der Pfote	CVN, Metronidazol	Umweltallergie
4184	9 m nk	Mischling	Krusten im Bereich des Rückens	ENR, MAR	Umweltallergie
4384	8 w nk	Foxterrier	Generalisiert schuppig und alopezisch	CF	Nicht bekannt
4430	8 mk	Mischling	Entzündung nach Penisspitzen- amputation	AUG, CVN	Infektion nach chirurgischem Eingriff
4489	13 mk	Lhasa Apso	Ohrentzündung	ENR	Hypothyreose

<sup>1</sup> Alter angegeben in Jahren (außer Nr. 876: Angabe in Monaten)<sup>2</sup> ♀/♂ = Geschlecht: mk = männlich kastriert; m nk = männlich nicht-kastriert; wk = weiblich kastriert; w nk = weiblich nicht-kastriert<sup>3</sup> DSH = Deutscher Schäferhund<sup>4</sup> Junghunde-Pyodermie<sup>5</sup> WHWT = West Highland White Terrier

### **2.1.1. Speziesidentifizierungen**

Von den 17 Hunden mit multiresistenten Staphylokokken wurden bei neun Hunden MRSP (53 %), bei vier Hunden MRSH (24 %), bei einem Hund MRSA (5,9 %) und bei drei Hunden (17 %) multiresistenten *S. pseudintermedius* (mRSP) ohne Methicillinresistenz nachgewiesen.

#### **2.1.1.1. MRSP bei Hunden und Besitzern**

Bei den insgesamt neun MRSP-Fällen wurde bei zwei Besitzern in Nase oder Rachen ebenfalls MRSP nachgewiesen. Fünf der Patientenbesitzer wiesen mit MRSP kontaminierte Hände auf (s. Tabelle IV-5). Gelegentlich wurden zusätzlich MRSE oder MRSH isoliert (s. Tabelle IV-5). Insbesondere bei den Besitzern konnten zusätzlich MRSE nachgewiesen werden. Patient Nr. 3674 wurde stationär in die Klinik aufgenommen. Daher wurden anstatt der Besitzerproben Proben der behandelnden Tierärzte entnommen. Bei Tierarzt Nr. 1 konnte sowohl an den Händen als auch in der Nase MRSP nachgewiesen werden. Tierarzt Nr. 2 war in der Nase mit MRSA kolonisiert. Die Probenentnahme wurde eine Woche nach Beendigung des Patientenkontaktes wiederholt. Tierarzt Nr. 1 wies keine weitere Kolonisierung mit MRSP auf, während bei Tierarzt Nr. 2 weiterhin MRSA nachgewiesen wurde.

**Tabelle IV-5: Übersicht der isolierten Staphylokokken bei Hunden mit MRSP-Nachweis**

Tier									Besitzer/Tierarzt		
Nr.	Läsion	Entnahmestelle der Läsion	Pharynx	Nase	Pfoten	inguinal	perianal	Gehörgang	Nase	Hände	Pharynx
115	MRSP	Vulvafalte	MRSP	neg <sup>1</sup>	neg	MRSP	neg	neg	neg	neg	neg
126	MRSP	Pfoten	MRSP	MRSP	MRSP MRSE	MRSP	MRSP	MRSP	MRSP	MRSP	MRSP
735	MRSP	Gehörgang	MRSP	MRSP	MRSP	MRSP	neg	= Läsion	neg	MRSP	neg
1850	MRSP	Pfoten	MRSP	MRSP	MRSP	neg	MRSP	MRSP	neg	neg	neg
3164	MRSP	Knoten Pfote	neg	<i>S. sciuri</i> <sup>2</sup>	MRSE	neg	neg	neg	neg	neg	neg
3674	MRSP	Kopf	MRSP	MRSP	MRSP	MRSP	MRSP MRSH	MRSP	T1 <sup>3</sup> : MRSP MRSE T2: MRSA MRSE	MRSP  neg	MRSE  neg
3734	MRSP	Pfoten	MRSP	MRSP	= Läsion	MRSP	neg	MRSP	MRSP MRSE	MRSP MRSE	MRSE
4430	MRSP	Penisspitze	MRSP	neg	MRSP	MRSP	MRSP	neg	neg	MRSP	neg
4489	MRSP	Brust	MRSP	MRSP	MRSP	MRSP	MRSP	MRSP	MRSE	MRSP MRSE	neg

<sup>1</sup> negativ; <sup>2</sup> *S. sciuri* mit *mecA*-Gen; <sup>3</sup> T1/T2= Tierarzt1 und 2: Patient Nr. 3674 wurde stationär in die Klinik aufgenommen. Daher wurden anstatt der Besitzer die behandelnden Tierärzte beprobt.

### **2.1.1.2. MRSH bei Hunden und Besitzern**

Bei zwei der vier MRSH-Fälle handelte es sich um lokalisierte Infektionen, bei denen nur an der jeweiligen Läsionsstelle MRSH nachgewiesen wurde. Bei den Besitzern konnte kein MRSH nachgewiesen werden. Die anderen zwei MRSH-Fälle waren generalisierte Infektionen, bei denen an mehreren Entnahmestellen und auch beim jeweiligen Besitzer MRSH nachgewiesen werden konnte (s. Tabelle IV-6).

Zusätzlich konnte bei drei MRSH-Fällen ein Methicillin-sensibler *S. pseudintermedius* an der Entnahmestelle nachgewiesen werden. Bei einem MRSH-Fall wurde zusätzlich *Ps. aeruginosa* als beteiligter Erreger einer Ohrinfektion nachgewiesen.



**Tabelle IV-6: Übersicht der isolierten Staphylokokken bei Hunden mit MRSH-Nachweis**

Tier									Besitzer		
Nr.	Läsion	Entnahmestelle der Läsion	Pharynx	Nase	Pfoten	inguinal	perianal	Gehörgang	Nase	Hände	Pharynx
279	MRSH	Gehörgang	neg <sup>1</sup>	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
818	MRSH	Gehörgang	MRSH	MRSH	MRSH	MRSH	MRSH	neg	MRSH	MRSH	MRSH
4384	MRSH	Rücken	neg	MRSH MRSE	neg	MRSE	neg	neg	MRSH MRSE	MRSH MRSE	neg
4669	MRSH	Pfoten	neg	MRSE	neg	neg	MRSE	neg	neg	neg	neg

<sup>1</sup> negativ

**2.1.1.3. mRSP bei Hunden und Besitzern**

Als mRSP wurden Stämme definiert, welche eine Resistenz gegen mehr als drei Antibiotikaklassen aufwiesen, bei denen jedoch keine Methicillinresistenz detektiert werden konnte. mRSP konnten in allen drei Fällen an mehreren Tupferentnahmestellen nachgewiesen werden. Zwei der Besitzer trugen mRSP in der Nase, während bei einem Besitzer nur die Hände mit mRSP kontaminiert waren (s. Tabelle IV-7).

**Tabelle IV-7: Übersicht der isolierten Staphylokokken bei Hunden mit mRSP-Nachweis**

Tier									Besitzer		
Nr.	Läsion	Entnahmestelle der Läsion	Pharynx	Nase	Pfoten	inguinal	perianal	Gehörgang	Nase	Hände	Pharynx
<b>876</b>	mRSP	Rücken	mRSP	mRSP	MRSE	mRSP MRSE	MRSE	mRSP MRSE	mRSP MRSE	MRSE	MRSE
<b>1136</b>	mRSP	Gehörgang	neg <sup>1</sup>	mRSP	mRSP MRSE	mRSP	neg	neg	mRSP MRSE	MRSE	MRSE
<b>4184</b>	mRSP	Rücken	neg	mRSP	mRSP	mRSP	mRSP	mRSP	neg	mRSP	neg

<sup>1</sup> negativ

#### **2.1.1.4. MRSA bei Hund und Besitzer**

Von den insgesamt 27 beprobten Hunden war ein Hund (Proben-Nr. 1015) mit MRSA besiedelt. MRSA konnte in der Nasenfalte, im Pharynx und in der Nase nachgewiesen werden. Beim Besitzer konnte aus allen entnommenen Proben MRSE nachgewiesen werden. MRSA wurde von den Handflächen des Besitzers isoliert.

#### **2.1.2. Phänotypische Empfindlichkeitsbestimmungen**

Die Ergebnisse der phänotypischen Resistenzbestimmung mittels Agardiffusionstest und Bouillon-Mikrodilution sind in den Tabellen IV-8 bis IV-10 dargestellt.

##### **2.1.2.1. Empfindlichkeitsbestimmung der MRSP-Stämme**

Die Resistenzprofile der MRSP-Fälle sind in Tabelle IV-8 dargestellt. Konnte MRSP sowohl vom Tier als auch vom Besitzer isoliert werden, so wurden die Resistenzmuster zwischen Tier und Besitzer verglichen. Alle MRSP-Resistenzmuster bei den Hunde-Besitzer-Paaren von den verschiedenen Tupferentnahmestellen waren identisch mit Ausnahme von Probe Nr. 4430, bei der eine Chloramphenicol-Resistenz nur für die MRSP-Isolate vom Tier, nicht aber für die vom Besitzer nachgewiesen werden konnte.

Alle MRSP-Stämme wiesen eine Resistenz gegenüber den untersuchten  $\beta$ -Laktamen, Cephalosporinen, Makroliden, Lincosamiden, Fluorchinolonen und Trimethoprim-Sulfonamiden auf (s. Tabelle IV-8). Hingegen waren alle Stämme sensibel gegenüber Vancomycin. Ebenso konnte bei allen Stämmen, außer Probe Nr. 3674, eine Sensibilität gegen das Carbapenem Imipenem nachgewiesen werden. Als einziger MRSP-Stamm zeigte Probe Nr. 1850 eine Mupirocin-Resistenz. Die Empfindlichkeit der MRSP-Stämme gegenüber Chloramphenicol war unterschiedlich. Fünf MRSP-Stämme waren gegenüber Chloramphenicol resistent, drei Stämme waren sensibel und ein Stamm intermediär empfindlich. Ebenso war die Empfindlichkeit gegenüber Doxycyclin verschieden. Zwei MRSP-Stämme waren resistent, vier sensibel und drei intermediär empfindlich gegenüber Doxycyclin.

Unterschiedliche Resistenzprofile konnten für die Aminoglykoside Amikacin und Gentamicin bestimmt werden. Mit Ausnahme von Probe Nr. 1850 mit intermediärer Empfindlichkeit waren alle MRSP-Stämme resistent gegenüber Gentamicin. Dagegen konnte für alle MRSP-Stämme, außer Probe Nr. 735, eine Empfindlichkeit gegenüber Amikacin nachgewiesen werden.

##### **2.1.2.2. Empfindlichkeitsbestimmung der MRSH-Stämme**

Die Ergebnisse der phänotypischen Empfindlichkeitsbestimmung der MRSH-Stämme sind in

Tabelle IV-10 dargestellt. Für die MRSH-Fälle 818 und 4384 konnten gleiche Resistenzprofile bei Hund und jeweiligem Besitzer nachgewiesen werden.

Alle vier MRSH-Stämme wiesen eine Resistenz gegenüber  $\beta$ -Laktamen, Cephalosporinen (Ausnahme Nr. 4669: Cefalothin intermediär wirksam) und Makroliden auf (s. Tabelle IV-9). Eine Sensibilität gegenüber Imipenem, Mupirocin und Vancomycin konnte für alle MRSH-Stämme gezeigt werden.

Die MRSH-Stämme 279, 818 und 4384 waren gegenüber den Aminoglykosiden Amikacin und Gentamicin resistent, hingegen erfolgte für MRSH-Stamm 4669 eine Einstufung im sensiblen oder intermediären Bereich (s. Tabelle IV-9). Die MRSH-Stämme 818 und 4384 waren resistent gegenüber Doxycyclin, während MRSH-Stamm 4669 als sensibel und MRSH-Stamm 279 als intermediär gegenüber Doxycyclin eingestuft wurde.

Die MRSH-Stämme 279, 818 und 4384 zeigten eine Erythromycin-Resistenz bei gleichzeitiger Sensibilität gegenüber Clindamycin.

#### **2.1.2.3. Empfindlichkeitsbestimmung der mRSP-Stämme**

Die Ergebnisse der phänotypischen Empfindlichkeitsbestimmung der mRSP-Stämme sind in Tabelle IV-10 dargestellt. Alle mRSP-Stämme wiesen eine Sensibilität gegenüber Amoxicillin-Clavulansäure, Cephalosporinen, Carbapenemen, Vancomycin und Mupirocin auf. Eine Resistenz der mRSP-Stämme konnte gegenüber Ampicillin, Chloramphenicol und Fluorchinolonen (Ausnahme Proben-Nr. 876 mit Sensibilität gegenüber Marbofloxacin) beobachtet werden. Die Resistenzmuster der mRSP-Stämme für Aminoglykoside, Trimethoprim-Sulfonamide, Makrolide, Lincosamide und Doxycyclin waren unterschiedlich ausgeprägt (s. Tabelle IV-10).

#### **2.1.2.4. Empfindlichkeitsbestimmung der MRSA-Stämme**

Die Ergebnisse der phänotypischen Empfindlichkeitsbestimmung der MRSA-Stämme von Tier und Besitzer sind in Tabelle IV-11 dargestellt. Eine Resistenz der MRSA-Stämme von Proben Nr. 1015 konnte gegenüber  $\beta$ -Laktamen, Cephalosporinen und Fluorchinolonen beobachtet werden.

**Tabelle IV-8: Phänotypische Empfindlichkeit der MRSP-Stämme mittels Agardiffusionstest und Bouillon-Mikrodilution**

Proben Nr.	AK	CN	AUG	AMP	OX	IPM	CL	CPD	CVN	ENR	MAR	SXT	V	DA	E	C	DO	MUP
115	S <sup>1</sup>	R <sup>3</sup>	R	R	R	S	R	R	≥ 16 <sup>4</sup>	R	R	R	S	R	R	R	I <sup>2</sup>	S
126	S	R	R	R	R	S	R	R	≥ 16	R	R	R	S	R	R	R	R	S
735	R	R	R	R	R	S	R	R	≥ 16	R	R	R	S	R	R	S	R	S
1850	S	I	R	R	R	S	R	R	≥ 16	R	R	R	S	R	R	S	I	R
3164	S	R	R	R	R	S	R	R	≥ 16	R	R	R	S	R	R	R	S	S
3674	S	R	R	R	R	R	R	R	≥ 16	R	R	R	S	R	R	I	I	S
3734	S	R	R	R	R	S	R	R	≥ 16	R	R	R	S	R	R	R	S	S
4430	S	R	R	R	R	S	R	R	≥ 16	R	R	R	S	R	R	R	S	S
4489	S	R	R	R	R	S	R	R	≥ 16	R	R	R	S	R	R	S	S	S

<sup>1</sup> Sensibel; <sup>2</sup> Intermediär; <sup>3</sup> Resistent; <sup>4</sup> Angabe in µg/ml; Kein Grenzwert nach CLSI vorhanden

Angabe der MHK-Werte in Anhang IX.5.1

**Tabelle IV-9: Phänotypische Empfindlichkeit der MRSH-Stämme mittels Agardiffusionstest und Bouillon-Mikrodilution**

Proben Nr.	AK	CN	AUG	AMP	OX	IPM	CL	CPD	CVN	ENR	MAR	SXT	V	DA	E	C	DO	MUP
279	R <sup>3</sup>	R	R	R	R	S <sup>1</sup>	R	R	≥ 16 <sup>4</sup>	S	S	S	S	S	R	S	I <sup>2</sup>	S
818	R	R	R	R	R	S	R	R	≥ 16	R	R	R	S	S	R	S	R	S
4384	R	R	R	R	R	S	R	R	≥ 16	R	R	R	S	S	R	S	R	S
4669	S	I	R	R	R	S	I	R	≥ 16	R	R	R	S	I	R	R	S	S

<sup>1</sup> Sensibel; <sup>2</sup> Intermediär; <sup>3</sup> Resistent; <sup>4</sup> Angabe in µg/ml; Kein Grenzwert nach CLSI vorhanden

Angabe der MHK-Werte in Anhang IX.5.2.

**Tabelle IV-10: Phänotypische Empfindlichkeit der mRSP-Stämme mittels Agardiffusionstest und Bouillon-Mikrodilution**

Proben Nr.	AK	CN	AUG	AMP	OX	IPM	CL	CPD	CVN	ENR	MAR	SXT	V	DA	E	C	DO	MUP
876	S <sup>1</sup>	S	S	R <sup>2</sup>	S	S	S	S	0,03 <sup>3</sup>	R	S	R	S	R	R	R	R	S
1136	S	S	S	R	S	S	S	S	0,06	R	R	S	S	R	R	R	S	S
4184	S	R	S	R	S	S	S	S	0,03	R	R	R	S	S	S	R	R	S

<sup>1</sup> Sensibel; <sup>2</sup> Resistent; <sup>3</sup> Angabe in µg/ml; Kein Grenzwert nach CLSI vorhanden  
 Angabe der MHK-Werte in Anhang IX.5.3.

**Tabelle IV-11: Phänotypische Empfindlichkeit der MRSA-Stämme mittels Agardiffusionstest und Bouillon-Mikrodilution**

Nr.	AK	CN	AUG	AMP	OX	IPM	CL	CPD	CVN	ENR	MAR	SXT	V	DA	E	C	DO	MUP
1015	S <sup>1</sup>	S	R	R <sup>2</sup>	R	S	R	R	≥ 16 <sup>3</sup>	R	R	R	S	S	S	S	S	S

<sup>1</sup> Sensibel; <sup>2</sup> Resistent; <sup>3</sup> Angabe in µg/ml; Kein Grenzwert nach CLSI vorhanden  
 Angabe der MHK-Werte in Anhang IX.5.4.

### 2.1.3. Molekularbiologische Charakterisierungen

Molekularbiologische Charakterisierungen wurden durchgeführt, um Stämme der von Hund und Besitzer isolierten multiresistenten Staphylokokken vergleichen zu können. Außerdem konnte mit Hilfe Microarray-basierter Typisierungsverfahren die genotypische Empfindlichkeit der Staphylokokkenstämme bestimmt werden, welche mit der phänotypischen Empfindlichkeit verglichen wurde.

#### 2.1.3.1. *spa*-Typisierungen

##### 2.1.3.1.1. *spa*-Typisierungen der MRSP-Stämme

Die *spa*-Typisierung der MRSP-Stämme erfolgte mit Hilfe der von MOODLEY et al. (2009; s. Abbildung IV-1 und IV-2) angegebenen *spa*-Typen. Bei der *spa*-Typisierung der MRSP-Stämme konnten die *spa*-Typen t02 und t06 bestimmt werden (s. Tabelle IV-12). Es wurde der gleiche *spa*-Typ bei Hund und jeweiligem Besitzer bestimmt. Für die MRSP-Stämme von Nr. 3734 konnte von den Hundeproben sowohl der *spa*-Typ t06 als auch der *spa*-Typ t02 (Probe inguinal und perianal) nachgewiesen werden. Die isolierten MRSP-Stämme vom Besitzer wiesen den *spa*-Typ t06 auf (s. Tabelle IV-12). Bei den MRSP-Stämmen von Nr. 126 konnte sowohl der *spa*-Typ t02 als auch der *spa*-Typ t06 (Probe Pharynx) detektiert werden.

<i>spa</i> repeat code	DNA sequence										Amino Acid sequence
r01	GGT	GAA	AAC	AAA	GCT	GAA	GAC	AAA	GGC	AAC	GENKAEDKGN
r02	AAA	GAA	AAC	AAA	GCT	GAA	GAT	AAA	GGC	AGC	KENKAEDKGS
r03	AAA	GAA	GAC	AAA	GCT	GAA	GAT	AAA	GGC	AGC	KEDKAEDKGS
r04	ATA	GAA	GAT	AAA	GCT	AAA	GAC	AAA	GAC	AAC	IEDKAKDKDN
r05	AAA	GAA	GGC	AAA	GCT	GCA	GAC	AAA	GGT	ATG	KEGKAADKGM
r06	AAA	GAA	GAT	AAA	GCT	AAA	GAC	AAA	GAC	AAC	KEDKAKDKDN
r07	AAA	GAA	GGC	AAA	GCT	GCA	CAC	AAA	GGT	ATG	KEGKAHKGGM
r08	AAA	GAA	GGC	AAA	GCT	GCA	AAC	AAA	GGT	ATG	KEGKAANKGM
r09	AAA	GGC	AAC	AAA	GCT	GAA	GAT	AAA	GGC	AGC	KGNKAEDKGS
r10	AAA	GAA	GAC	AAA	GCT	GAA	GAT	AAA	GGC	AAC	KEDKAEDKGN
r11	AAA	GAA	GAC	CAA	GCT	GAA	GAT	AAA	GGC	AGC	KEDQAEDKGS
r12	AAA	GAA	AAC	AAA	GCT	GAA	GAC	AAA	GGC	AAC	KENKAEDKGN
r13	AAA	GAA	GAT	AAA	GCT	GAA	GAT	AAA	GGC	AGC	KEDKAEDKGS
General Consensus	AAA	GAA	GAC	AAA	GCT	GAA	GAC	AAA	GGC	AXC	KEXKAEDKGX
Motif 1	AAA	GAA	XXX	AAA	GCT	XAA	XXX	AAA	GXX	XXX	
Motif 2	XXX	GAA	XXX	AAA	GCT	XAA	GAC	AAA	GXX	XXX	

Abbildung IV-1: Aus Moodley et al. (2009): DNA-Sequenzen mit sich daraus ergebenden Repeat-Sequenzen.



<i>spa</i> type	Repeat sequence
t01	r01 r02 r03 r03 r03 r03 r04 r05
t02	r01 r02 r03 r03 r03 r06 r05
t03	r01 r02 r03 r03 r03 r06 r07
t04	r01 r02 r03 r03 r03 r06 r08
t05	r01 r02 r03 r03 r03 r03 r06 r05
t06	r01 r02 r03 r03 r06 r05
t07	r01 r09 r03 r10 r02 r03 r06 r05
t08	r01 r02 r11 r03 r03 r06 r05
t09	r01 r12 r02 r02 r03 r13 r03 r06 r05

**Abbildung IV-2:** Aus Moodley et al. (2009): Repeat-Sequenzen mit sich daraus ergebenden *spa*-Typen

**Tabelle IV-12:** Ergebnisse der *spa*-Typisierung der MRSP-Stämme

Proben Nr.	MRSP-Stämme von	
	Tier	Besitzer
115	t02	- <sup>1</sup>
126	t02, t06 (Pharynx) <sup>2</sup>	t02
735	t02	t02
1850	t02	-
3164	t02	-
3674	t02	t02
3734	t06, t02 (inguinal & perianal) <sup>3</sup>	t06
4430	t02	t02
4489	t02	t02

<sup>1</sup> Keine MRSP-Stämme beim Besitzer nachgewiesen (s. Tabelle IV-6)

<sup>2</sup> Der *spa*-Typ t06 wurde beim MRSP-Stamm, welcher aus dem Pharynx isoliert wurde, bestimmt.

<sup>3</sup> Der *spa*-Typ t02 wurde bei den MRSP-Stämmen, welche inguinal und perianal isoliert wurden, bestimmt.

#### 2.1.3.1.2. *spa*-Typisierungen der MRSA-Stämme

Bei der *spa*-Typisierung der MRSA-Stämme von Proben Nr. 1015 wurde bei den drei isolierten MRSA-Stämmen der *spa*-Typ t1214 bestimmt. Die Sequenzanalyse erfolgte mittels Ridom Spa Server ([www.spaserver.ridom.de](http://www.spaserver.ridom.de)). Abbildung IV-3 zeigt die Sequenz des *spa*-Typ 1214.

Die repeat-Abfolge lautete: 26-23-23-13-23-31-29-17-31-29-17-25-16-28.

```

                                r26                                r23
GCTAAACGATGCTCAAGCACCAAAAGAGGAAGACAACAAAAACCTGGTAAAGAAGACGG
                                r23                                r13
CAACAAACCTGGCAAAGAAGACGGCAACAAACCTGGCAAAGAAGACAACAACAAACCTGG
                                r23                                r31                                r29
TAAAGAAGACGGCAACAAACCTGGCAAAGAAGATGGCAACAAACCTGGCAAAGAAGACAA
                                r17                                r31
CAAAAAGCCTAGCAAAGAAGACGGCAACAAGCCTGGTAAAGAAGATGGCAACAAACCTGG
                                r29                                r17                                r25
CAAAGAAGACAACAAAAAGCCTAGCAAAGAAGACGGCAACAAGCCTGGTAAAGAAGATGG
                                r17                                r25
CAACAAACCTGGTAAAGAAGACGGCAACAAGCCTGGTAAAGAAGATGGCAACAAACCTGG
                                r16                                r28
TAAAGAAGACGGCAACAAACCTGGTAAAGAAGATGGTAACAAACCTGGCAAAGAAGACGG
CAACGGGGTACATGTCGTTAAACCTGGTGATACAGTAAATGACATTGCAAAAGCAAACGG
CACTACTGCTGAACAACC

```

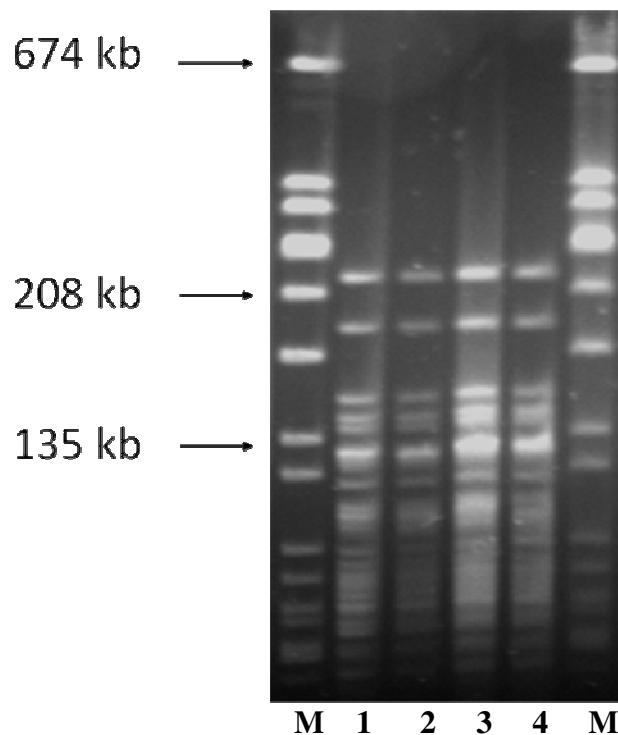
**Abbildung IV-3: Sequenz des *spa*-Typs 1214 der MRSA-Stämme von Proben Nr. 1015**

### 2.1.3.2. Makrorestriktionsanalyse

#### 2.1.3.2.1. Makrorestriktionsanalyse der MRSP-Stämme

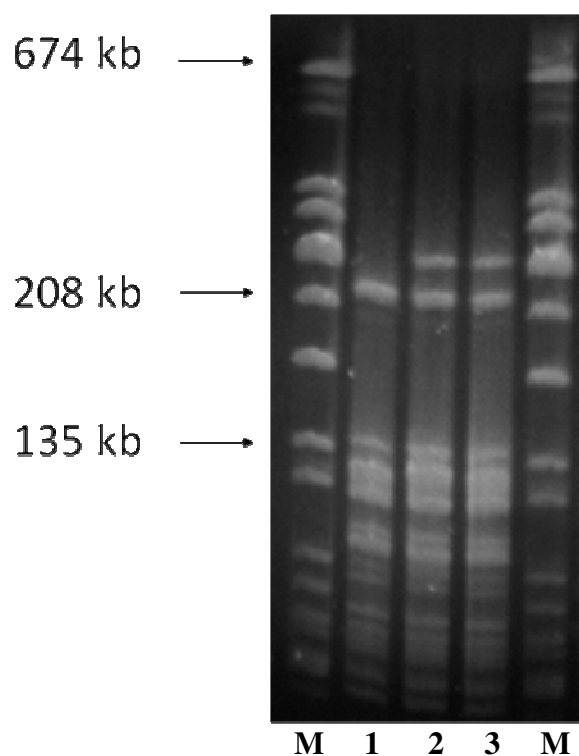
Bei der Makrorestriktionsanalyse für die MRSP-Stämme der Proben 126, 735, 3674, 4430 und 4489 konnten gleiche Bandenmuster für Hund und jeweiligen Besitzer bzw. Tierarzt nachgewiesen werden (s. Abbildung IV-4 für Proben Nr. 126). Die MRSP-Stämme von Proben Nr. 3734, welche aus dem inguinalen und perianalen Bereich isoliert wurde, unterschieden sich im Bandenmuster von den anderen MRSP-Isolaten des Hundes und Besitzers.

Bei Vergleich der MRSP-Fälle untereinander konnten unterschiedliche Bandenmuster beobachtet werden, wobei sich die MRSP-Stämme von Nr. 4430 und 4489 nur durch eine Bande unterschieden (s. Abbildung IV-5).



**Abbildung IV-4: Makrorestriktionsanalyse mit anschließender PFGE von MRSP-Stämmen der Probe 126.**

M = Marker; 1 = Tier Läsionsbereich; 2 = Tier Pharynx; 3 = Besitzer Nase; 4 = Besitzer Hände

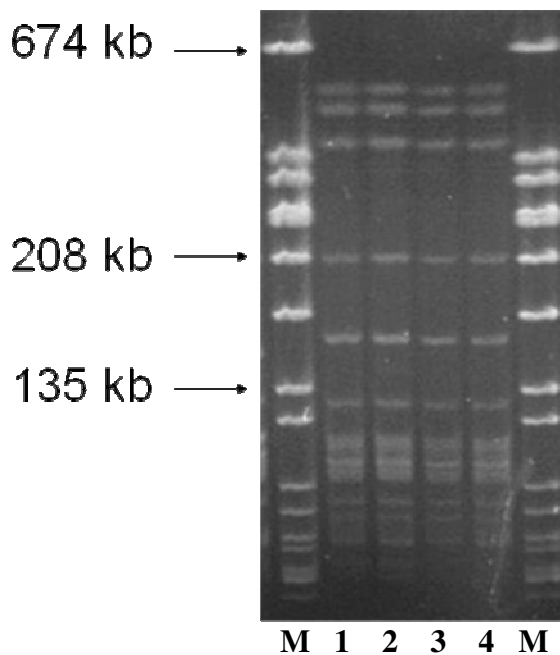


**Abbildung IV-5: Makrorestriktionsanalyse mit anschließender PFGE der MRSP-Stämme von 4430 und 4489**

M = Marker; 1 = 4430; 2 und 3 = 4489

### 2.1.3.2.2. Makrorestriktionsanalyse der MRSH-Stämme

Die Makrorestriktionsanalyse der MRSH-Stämme von Proben Nr. 818 und 4384 ergab gleiche Bandenmuster bei beiden Hunde-Besitzerpaaren (s. Abb. IV-6). Ein Vergleich der Bandenmuster von den MRSH-Stämmen der Proben Nr. 818 und 4384 erbrachte identische Bandenmuster, wobei sich die MRSH-Stämme der Proben 279 und 4669 deutlich unterschieden.



**Abb. IV-6: Makrorestriktionsanalyse mit anschließender PFGE der MRSH-Stämme von Probe 4384**

M = Marker; 1 = Läsionsbereich Tier; 2 = Nase Tier; 3 = Nase Besitzer; 4 = Hände Besitzer

### 2.1.3.3. Microarray-basierte Genotypisierungen

#### 2.1.3.3.1. Genotypisierung der MRSP-Stämme

Die Microarray-basierte Bestimmung der Resistenzgene ist in Tabelle IV-13 dargestellt. Der Nachweis des *mecA*-Gens sowie des *blaZ*-Gens und seiner Regulator-Gene bestätigten die phänotypisch ermittelte Resistenz gegenüber  $\beta$ -Laktamen und Cephalosporinen. Bei allen MRSP-Isolaten konnte das *erm(B)*-Gen, welches die Resistenz der Stämme gegenüber Makroliden und Lincosamiden erklärt, sowie ein *aac-aphD*- und *aphA*-Gen, welches für die Resistenz gegenüber Gentamicin verantwortlich ist, nachgewiesen werden. Die MRSP-Stämme von 115, 126, 3164, 3674, 3734 und 4430 enthielten ein *cat*-Gen der sich daraus ergebenden Chloramphenicol-Resistenz. Für die MRSP-Isolate von 115, 126, 735, 1850 und 3674 konnte das *tet(K)*-Gen bestätigt werden. Das *mup*-Gen konnte für die MRSP-Isolate von 1850 nachgewiesen werden. Beim Vergleich der Resistenzgenbestimmung der MRSP-Isolate von Hund und jeweiligem Besitzer konnten identische Resistenzgene festgestellt werden. Eine Ausnahme

waren die MRSP-Isolate von 4430. Die isolierten MRSP-Stämme vom Besitzer wiesen im Gegensatz zu den MRSP-Isolaten vom Tier keine Chloramphenicol-Resistenz auf.

Die Microarray-basierte SCC*mec*-Typisierung der MRSP-Stämme ergab die folgenden Gene: *mecA*, *mecR*, *mecI*, *ccrA-3* und *ccrB-3*. Daher handelt es sich bei den MRSP-Stämmen um den SCC*mec*-Typ II-III oder den SCC*mec*-Typ III. Die An- bzw. Abwesenheit des Kadmium-Resistenz-Operons, wodurch eine Differenzierung beider Typen möglich ist, konnte nicht mit den verfügbaren Methoden detektiert werden.

#### **2.1.3.3.2. Genotypisierung der MRSH-Stämme**

Die Resistenzgenbestimmung der MRSH-Isolate ist in Tabelle IV-14 aufgeführt. Für alle MRSH-Stämme konnte das *mecA*- und *blaZ*-Gen nachgewiesen werden. Weiterhin konnte für alle MRSH-Isolate das *qacA*-Gen bestimmt werden, welches für eine unspezifische Efflux-Pumpe kodiert (s. II-5.3.9.1.). Die MRSH-Stämme von 279, 818 und 4384 wiesen eine durch das *msrA* und das *mpbBM*-Gen vermittelte Makrolid-Resistenz auf. Hingegen konnten für den MRSH-Stamm der Probe 4669 das *ermC*- und das *linA*-Gen nachgewiesen werden, welche eine Makrolid- und Lincosamid-Resistenz vermitteln (s. Tabelle IV-10).

Die Aminoglykosid-Resistenz ergab sich durch die Anwesenheit eines *aacA-aphD*-Gens bei allen MRSH-Isolaten, sowie teilweise durch ein *aadD*- und *aphA*-Gen (s. Tabelle IV-14).

Für die MRSH-Isolate von Probe Nr. 818 und 4384 konnte das Q6GD50-Gen bestimmt werden, welches für ein vermutetes Fusidinsäure-Resistenz-Protein kodiert. Die MRSH-Stämme von 279, 818 und 4384 trugen das *tet(K)*-Gen. Für die MRSH-Isolate von Proben Nr. 818 und 4384, welche aus zwei anderen Entnahmestellen als der Läsion stammten, konnte zusätzlich das *tet(M)*-Gen nachgewiesen werden. Überdies waren die ermittelten Resistenzgene von Hund und Besitzer bei Proben Nr. 818 und 4384 identisch. Das MRSH-Isolat von Proben Nr. 4669 wies eine Chloramphenicol-Resistenz auf, welche durch ein *cat*-Gen bedingt war.

Für die MRSH-Isolate war mittels StaphyType Kit keine SCC*mec*-Typisierung möglich, da dieses Testverfahren spezifisch für MRSA, nur bedingt für MRSP und zumindest bisher nicht für MRSH geeignet ist.

#### **2.1.3.3.3. Genotypisierung der mRSP-Stämme**

Die Microarray-basierte Resistenzgenbestimmung der mRSP-Isolate ist in Tabelle IV-15 dargestellt. Für alle mRSP-Stämme konnte kein *mecA*-Gen bestimmt werden. Bei allen Isolaten konnten das *blaZ*- und ein *cat*-Gen nachgewiesen werden; eine Ausnahme war die Besitzerprobe von 876, bei der kein *cat*-Gen detektiert wurde. Die mRSP-Isolate von 876 und 1136 wiesen das

*erm(B)*- und das *aphA*-Gen auf. Das *tet(M)*-Gen konnte für die mRSP-Isolate von 876 und 4184 detektiert werden. Alle mRSP-Stämme von Probe Nr. 4184 trugen das *aacA-aphD*-Gen. Die Ergebnisse der Resistenzgenbestimmung bestätigten die phänotypisch ermittelten Resistenzprofile der mRSP-Stämme.

#### **2.1.3.3.4. Genotypisierung des MRSA-Stämme**

Über die Microarray-basierte Resistenzgenbestimmung der MRSA-Isolate von Proben Nr. 1015 konnten das *mecA*- und das *blaZ*-Gen nachgewiesen werden. Weitere Resistenzgene konnten nicht detektiert werden.

Durch den Gennachweis von *mecA*, *Delta-mecR*, *ccrA-2* und *ccrB-2* konnte der SCC*mec*-Typ IV bestimmt werden (s. Tabelle IV- 16). Das Panton-Valentin-Leukozidin als Virulenzfaktor konnte nicht detektiert werden.

Tabelle IV-13: Resistenzgene der MRSP-Stämme

Gene	126 Läsion	735 Läsion	1850 Läsion	3164 Läsion	3674 Läsion	3734 Läsion	4430 Läsion	115 Läsion	4489 Läsion	Erläuterung der Resistenzen
<i>mecA</i>	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	Methicillin, Oxacillin und alle $\beta$ -Laktame
<i>blaZ</i>	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	$\beta$ -Laktamase
<i>blaI</i>	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	$\beta$ -Lactamase Repressor
<i>blaR</i>	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	$\beta$ -Lactamase Regulator Protein
<i>erm(A)</i>	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	Macrolide, Lincosamide, Streptogramin
<i>erm(B)</i>	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	Macrolide, Lincosamide, Streptogramin
<i>erm(C)</i>	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	Macrolide, Lincosamide, Streptogramin
<i>linA</i>	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	Lincosamides
<i>msrA</i>	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	Macrolide
<i>mpbBM</i>	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	Macrolide
<i>aacA-aphD</i>	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	Aminoglycoside (Gentamicin, Tobramycin)
<i>aadD</i>	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	Aminoglycoside (Tobramycin, Neomycin)
<i>aphA</i>	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	Aminoglycoside (Kanamycin, Neomycin)
<i>dfrA</i>	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	Trimethoprim
<i>far</i>	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	Fusidinsäure
<i>Q6GD50</i>	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	Vermutetes Fusidinsäure-Resistenz-Protein
<i>mupR</i>	neg	neg	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	Mupirocin
<i>tet(K)</i>	pos	pos	pos	neg	pos	neg	neg	pos	neg	Tetracycline
<i>tet(M)</i>	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	Tetracycline
<i>tet(Efflux)</i>	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	Tetracyclin Efflux Protein
<i>cat</i>	pos	neg	neg	pos	pos	pos	pos	pos	neg	Chloramphenicol
<i>vanA</i>	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	Vancomycin
<i>vanB</i>	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	Vancomycin
<i>vanZ</i>	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	Vancomycin
<i>qacA</i>	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	Unspezifische Efflux-Pumpe
<i>qacC</i>	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	Unspezifische Efflux-Pumpe

<sup>1</sup> positiv <sup>2</sup> negativ

**Tabelle IV-14: Resistenzgene der MRSH-Stämme**

Gene	279 Läsion	818 Läsion	4384 Läsion	4669 Läsion	Erläuterung der Resistenzen
<i>mecA</i>	pos	pos	pos	pos	Methicillin, Oxacillin und alle $\beta$ -Laktame
<i>blaZ</i>	pos	pos	pos	pos	$\beta$ -Laktamase
<i>blaI</i>	pos	pos	pos	pos	$\beta$ -Lactamase Repressor
<i>blaR</i>	pos	pos	pos	pos	$\beta$ -Lactamase Regulator Protein
<i>erm(A)</i>	neg	neg	neg	neg	Macrolide, Lincosamide, Streptogramin
<i>erm(B)</i>	neg	neg	neg	neg	Macrolide, Lincosamide, Streptogramin
<i>erm(C)</i>	neg	neg	neg	pos	Macrolide, Lincosamide, Streptogramin
<i>linA</i>	neg	neg	neg	pos	Lincosamides
<i>msrA</i>	pos	pos	pos	neg	Macrolide
<i>mpbBM</i>	pos	pos	pos	neg	Macrolide
<i>aacA-aphD</i>	pos	pos	pos	pos	Aminoglycoside (Gentamicin, Tobramycin)
<i>aadD</i>	neg	pos	pos	neg	Aminoglycoside (Tobramycin, Neomycin)
<i>aphA</i>	neg	neg	neg	pos	Aminoglycoside (Kanamycin, Neomycin)
<i>dfrA</i>	neg	neg	neg	neg	Trimethoprim
<i>far</i>	neg	neg	neg	neg	Fusidinsäure
<i>Q6GD50</i>	neg	pos	pos	neg	Vermutetes Fusidinsäure-Resistenz-Protein
<i>mupR</i>	neg	neg	neg	neg	Mupirocin
<i>tet(K)</i>	pos	pos	pos	neg	Tetracycline
<i>tet(M)</i>	neg	neg	neg	neg	Tetracycline
<i>tet(Efflux)</i>	neg	neg	neg	neg	Tetracyclin Efflux Protein
<i>cat</i>	neg	neg	neg	pos	Chloramphenicol
<i>vanA</i>	neg	neg	neg	neg	Vancomycin
<i>vanB</i>	neg	neg	neg	neg	Vancomycin
<i>vanZ</i>	neg	neg	neg	neg	Vancomycin
<i>qacA</i>	pos	pos	pos	pos	Unspezifische Efflux-Pumpe
<i>qacC</i>	neg	neg	neg	neg	Unspezifische Efflux-Pumpe

<sup>1</sup> positiv <sup>2</sup> negativ



**Tabelle IV-15: Resistenzgene der mRSP-Stämme**

<b>Gene</b>	<b>876 Läsion</b>	<b>1136 Läsion</b>	<b>4184 Läsion</b>	<b>Erläuterung der Resistenzen</b>
<i>mecA</i>	neg	neg	neg	Methicillin, Oxacillin und alle $\beta$ -Laktame
<i>blaZ</i>	pos	pos	pos	$\beta$ -Laktamase
<i>blaI</i>	pos	pos	pos	$\beta$ -Laktamase Repressor
<i>blaR</i>	pos	pos	pos	$\beta$ -Laktamase Regulator Protein
<i>erm(A)</i>	neg	neg	neg	Macrolide, Lincosamide, Streptogramin
<i>erm(B)</i>	pos	pos	neg	Macrolide, Lincosamide, Streptogramin
<i>erm(C)</i>	neg	neg	neg	Macrolide, Lincosamide, Streptogramin
<i>linA</i>	neg	neg	neg	Lincosamide
<i>msrA</i>	neg	neg	neg	Macrolide
<i>mpbBM</i>	neg	neg	neg	Macrolide
<i>aacA-aphD</i>	neg	neg	pos	Aminoglycoside (Gentamicin, Tobramycin)
<i>aadD</i>	neg	neg	neg	Aminoglycoside (Tobramycin, Neomycin)
<i>aphA</i>	pos	pos	neg	Aminoglycoside (Kanamycin, Neomycin)
<i>dfrA</i>	neg	neg	neg	Trimethoprim
<i>far</i>	neg	neg	neg	Fusidinsäure
<i>Q6GD50</i>	neg	neg	neg	Vermutetes Fusidinsäure-Resistenz-Protein
<i>mupR</i>	neg	neg	neg	Mupirocin
<i>tet(K)</i>	neg	neg	neg	Tetracycline
<i>tet(M)</i>	pos	neg	pos	Tetracycline
<i>tet(Efflux)</i>	neg	neg	neg	Tetracyclin Efflux Protein
<i>cat</i>	pos	pos	pos	Chloramphenicol
<i>vanA</i>	neg	neg	neg	Vancomycin
<i>vanB</i>	neg	neg	neg	Vancomycin
<i>vanZ</i>	neg	neg	neg	Vancomycin
<i>qacA</i>	neg	neg	neg	Unspezifische Efflux-Pumpe
<i>qacC</i>	neg	neg	neg	Unspezifische Efflux-Pumpe

<sup>1</sup> positiv <sup>2</sup> negativ

**Tabelle IV-16: Darstellung der Microarray-basierten SCCmec-Typisierung von MRSA-Stämmen der Probe 1015 (SCCmec-Typ IV).**

Gene	Läsion Tier	Pharynx Tier	Nase Tier	Hände Besitzer	Erklärung
<i>mecA</i>	pos	pos	pos	pos	Methicillin, Oxacillin und alle $\beta$ -Lactame, definiert MRSA
<i>mecR</i>	neg	neg	neg	neg	Signal Transducer Protein MecR1
<i>Delta-mecR</i>	pos	pos	pos	pos	Signal Transducer Protein Delta-MecR1
<i>mecI</i>	neg	neg	neg	neg	Methicillin-Resistance Regulator Protein
<i>ugpQ</i>	pos	pos	pos	pos	Glycerophosphoryl-diester-Phosphodiesterase
<i>ccrA-1</i>	neg	neg	neg	neg	Rekombinase A, type 1
<i>ccrA-2</i>	pos	pos	pos	pos	Rekombinase A, type 2
<i>ccrA-3</i>	neg	neg	neg	neg	Rekombinase A, type 3
<i>ccrAA-MRSAZH47</i>	neg	neg	neg	neg	Rekombinase A, type ZH47
<i>ccrA-4</i>	neg	neg	neg	neg	Rekombinase A, type 4
<i>ccrB-1</i>	neg	neg	neg	neg	Rekombinase B, type 1
<i>ccrB-2</i>	pos	pos	pos	pos	Rekombinase B, type 2
<i>ccrB-3</i>	neg	neg	neg	neg	Rekombinase B, type 3
<i>ccrB-4</i>	neg	neg	neg	neg	Rekombinase B, type 4
<i>ccrC</i>	neg	neg	neg	neg	Rekombinase C

<sup>1</sup> positiv <sup>2</sup> negativ

## V. DISKUSSION

### 1. Vorstudie: Beurteilung von Selektivmedien zum Nachweis von MRSP

Aus klinischen Tupferproben können häufig Mischkulturen nachgewiesen werden. Der Nachweis von MRSP kann durch zusätzlich vorhandene Bakterien erschwert sein. Weiterhin dauert die Anzucht auf BAP mit anschließender Bestimmung der Methicillin-Resistenz mittels Agardiffusionsverfahren oder Bouillon-Mikrodilution mehr als 48 h. Daher wurden MRSA-Selektivmedien für die Detektion von MRSP aus klinischen Proben untersucht, da spezifische MRSP-Selektivmedien derzeit kommerziell nicht verfügbar sind. MRSA-Selektivmedien ermöglichen eine Speziesidentifizierung und den Nachweis der Methicillin-Resistenz innerhalb von 24 h. Ein geeignetes Selektivmedium sollte anschließend in der Hauptstudie zusätzlich zu nicht-selektiven Medien eingesetzt werden. Es wurden insgesamt fünf Selektivmedien mit verschiedenen Laborstämmen und Methoden vergleichend untersucht.

MSA wurde bereits für die direkte Bestimmung von MRSP aus klinischen Proben genutzt (HANSELMAN et al., 2008; MURPHY et al., 2009). Problematisch war bei diesem Agar der relativ hohe Gehalt an Oxacillin (5 mg/l), wodurch „Niedrig-Level“ resistente MRSP mit MHK-Werten von 4 µg/ml nicht detektiert werden können (SASAKI et al., 2007). Weiterhin war die Unterscheidung von MRSP und MRSA aufgrund der ähnlichen Koloniefarbe auf diesem Selektivmedium schwierig. Vor allem bei einer Inkubationszeit von mehr als 24 Stunden verfärbten sich sowohl die Kolonien von MRSP als auch von MRSA gelblich. Für MRSA und MRSP wurde die gleiche Koloniegröße bei 34 °C Inkubationstemperatur festgestellt, so dass auch der Parameter Koloniegröße nicht für eine Unterscheidung genutzt werden konnte. Hingegen konnten MRSP und MRSA auf ORSAB oder Brilliance-Selektivmedien gut unterschieden werden. Jedoch konnte MRSP aufgrund von Koloniefarbe, -form und -größe auf dem Brilliance-Selektivmedium für *S. sciuri* gehalten werden, während auf dem ORSAB-Selektivmedium MRSP große Ähnlichkeit zu MRSH aufwies.

Die Cefoxitin-basierten Selektivmedien wie CHROMagar und chromID waren nicht für die Detektion von MRSP geeignet. Acht von zehn MRSP-Isolaten

konnte auf dem chromID-Selektivmedium erst bei einer Verdünnungsstufe von 1:1000 nachgewiesen werden. Hierfür könnten die Antibiotika-Konzentrationen (s. Tabelle III-2, Seite 37), andere Inhibitoren, Indikatoren oder die Salzkonzentration verantwortlich sein. Es konnte kein Bezug zwischen dem Wachstum oder Nicht-Wachstum von MRSP und den vom Hersteller angegebenen Inhaltsstoffen und Konzentrationen hergestellt werden.

ORSAB- und Brilliance-Selektivmedien sind aufgrund dieser Studienergebnisse am besten für die Detektion von MRSP geeignet. Die Relevanz von MRSP in der Humanmedizin ist bisher nicht einschätzbar. Fallberichte über MRSP-Infektionen in der Humanmedizin sind in der letzten Zeit vermehrt veröffentlicht worden (Kempker et al., 2009; Stegmann et al., 2010). In der Studie von POTTUMARTHY et al. (2004) wird die These aufgestellt, dass MRSP-Infektionen beim Menschen eventuell unterschätzt werden, da das zoonotische Potential von MRSP nicht erkannt wird. In solchen Fällen wäre ein Selektivmedium, welches MRSP und MRSA unterscheiden kann, nützlich. Zukünftig sollten weitere klinische MRSP-Stämme untersucht werden, um Variationen in den Wachstumseigenschaften der Stämme ausschließen zu können.

Ein gutes Wachstum von MRSA konnte auf allen Selektivmedien beobachtet werden. ORSAB war weniger geeignet für die Identifizierung von MRSA, da die Unterscheidung von MRSA und *S. sciuri* anhand der Kolonie-Morphologie schwierig war. Die korrekte Identifizierung von MRSA ist bedeutsam, da aus kaninen klinischen Proben auch MRSA isoliert werden kann (GRIFFETH et al., 2008; HANSELMAN et al., 2008). Eine schnelle Detektion von MRSA ist vor allem aufgrund des zoonotischen Potentials wichtig.

Ein Vorteil aller untersuchten Selektivmedien war, dass das Schwärmphänomen von *Pr. mirabilis* nicht beobachtet werden konnte. Daher konnten aus klinischen Proben mit *Pr. mirabilis* und Methicilin-resistenten Staphylokokken die Staphylokokken isoliert werden, um weitere Untersuchungen wie beispielsweise eine Empfindlichkeitbestimmung durchführen zu können. Der Gebrauch von ORSAB oder Brilliance-Selektivmedien kann in Ergänzung zu nicht-selektiven Medien für das Screening auf Methicillin-resistente Staphylokokken aus kaninen klinischen Proben empfohlen werden. Für die Hauptstudie wurde der preisgünstigere ORSAB-Screening-Agar für die Detektion von Methicillin-resistenten Staphylokokken genutzt.

## **2. Hauptstudie: Screening hinsichtlich Methicillin-resistenter Staphylokokken**

### **2.1. Speziesidentifizierungen**

Bei 17 von 27 beprobten Hunden (63 %) konnten multiresistente Staphylokokken nachgewiesen werden. Dieser relativ hohe Anteil erklärt sich durch die Einschlusskriterien dieser Studie. Alle Hunde waren mit Antibiotika vorbehandelt und wiesen z.T. eine jahrelange Krankheitsgeschichte mit Haut- und Ohrinfektionen auf. Neun Hunde wiesen eine MRSP-Infektion auf (53 %). Bei vier Hunden konnte MRSH (24 %), bei drei Hunden mRSP (17 %) und bei einem Hund MRSA (5,9 %) nachgewiesen werden.

Alle Besitzer hatten engen Kontakt zu ihrem Hund, wodurch auch die Möglichkeit der Übertragung von multiresistenten Staphylokokken bestand. In dieser Studie wurde die Haltung im Haus, das Schlafen auf dem Bett oder Sofa und/oder das Lecken des Hundes durch das Gesicht des Besitzer als enger Kontakt gewertet. Diese Kriterien wurden bereits in anderen Studien für die Einschätzung des Hunde-Besitzer-Kontaktes genutzt (MORRIS et al., 2010). Es gibt bisher kein validiertes System, um den Kontakt zwischen Hund und Besitzer genauer definieren zu können. Bisherige Studien, welche die Übertragung von multiresistenten Staphylokokken zwischen Hund und Besitzer untersuchten, beschäftigten sich nicht damit, inwiefern die Lokalisation und Verbreitung auf dem Tier Auswirkungen auf die Wahrscheinlichkeit der Übertragung zum Besitzer hat (KEMPKER et al.; STEGMANN et al., 2010). Auffällig war in der vorliegenden Arbeit, dass bei einem Nachweis von MRSP und MRSH an nur einer Probenentnahmestelle die Besitzer nicht mit MRSP oder MRSH besiedelt waren und auch keine Kontamination der Hände nachzuweisen war. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass das Risiko der Besitzerbesiedlung bei nur lokalisiertem Nachweis von multiresistenten Staphylokokken gering ist. Eine genauere statistische Analyse war aufgrund der geringen Fallzahlen nicht möglich. Bei einem Tierarzt konnte eine transiente Kolonisierung mit MRSP nachgewiesen werden, welche nach Beendigung des Patientenkontaktes innerhalb einer Woche verschwand. Dieser Befund deckt sich mit früheren Studien und deutet auf nicht optimale Wachstumbedingungen für MRSP beim Menschen hin (FRANK et al. 2009; VINCZE et al. 2010). Bemerkenswert war, dass eine

Übertragung von MRSP zwischen Tierarzt und Hund möglich war, obwohl bei der Behandlung des Patienten Handschuhe und Schutzkleidung getragen wurden. Ein Übertragungsweg könnte hierbei die Kontamination von Klinikkleidung, Türklinken, Geräten oder anderen Gebrauchsmaterialien mit MRSP gewesen sein, welche mit und ohne Handschuhe angefasst wurden. Weitere Studien zur Kolonisierungsdauer von MRSP beim Menschen sind nötig, um das Infektionsrisiko des Menschen genauer einschätzen zu können.

## 2.2. Resistenzprofile

Die phänotypisch ermittelte Resistenz der Staphylokokken-Isolate wurde über die Microarray-basierte Bestimmung von ausgewählten Resistenzgenen bestätigt. Resistenzen gegen Fluorchinolone und Sulfonamide konnten nur phänotypisch ermittelt werden.

Bemerkenswert war, dass, neben der erwarteten Resistenz gegenüber  $\beta$ -Laktamen, alle MRSP-, MRSH-, mRSP- und MRSA-Stämme mit Ausnahme von Proben Nr. 279 eine Enrofloxacin-Resistenz (MHK-Werte  $\geq 4 \mu\text{g/ml}$ ) aufwiesen. Fluorchinolon-Resistenz entsteht über spontane chromosomale Mutationen im Bereich der Gene für Topoisomerase IV oder DNA-Gyrase. Zusätzlich kann die Induktion von Efflux-Pumpen erfolgen (LOWY, 2003). Das Risiko der Resistenzentwicklung gegenüber Fluorchinolonen ist hoch, insbesondere bei entsprechendem Selektionsdruck durch Fluorchinolon-Gabe und die Verwendung von subtherapeutischen Antibiotika-Konzentrationen (HOOPER, 2002; LOWY, 2003). Sechs der 17 Hunde (35 %) mit multiresistenten Staphylokokken wurden innerhalb der letzten drei Monate systemisch mit Enrofloxacin behandelt, so dass in diesen Fällen von einem Selektionsdruck auszugehen ist. Weiterhin spielt die Ausbreitung Fluorchinolon-resistenter Klone bei Infektionen mit multiresistenten Staphylokokken eine große Rolle. Der übliche empirische Gebrauch von Fluorchinolonen bei Verdacht auf multiresistente Staphylokokken kann aufgrund des häufigen Vorkommens von Fluorchinolon-Resistenzen nicht empfohlen werden. Die bakteriologische Untersuchung mit anschließender Empfindlichkeitsbestimmung der Bakterien-Isolate sollte für die Wahl eines geeigneten Antibiotikums genutzt werden.

Die MRSP-Isolate der Nr. 4430 vom Besitzer wiesen im Gegensatz zu den MRSP-Isolaten des Hundes kein *cat*-Gen auf, welches für eine Chloramphenicol-

Resistenz verantwortlich ist. Die *cat*-Gene sind auf Plasmiden lokalisiert und können über den Verlust eines Plasmid verloren gehen (SCHWARZ et al., 2004). Wahrscheinlicher handelt es sich jedoch um zwei unterschiedliche MRSP-Isolate. Der Besitzer könnte das MRSP-Isolat ohne *cat*-Gen vom selben Hund oder von einem anderen Hund erworben haben.

Für die MRSP-Isolate von Proben Nr. 1850 konnte eine Mupirocin-Resistenz nachgewiesen werden. Bisher wurde nur von einem MRSP-Isolat mit Mupirocin-Resistenz berichtet (FULHAM et al., 2011). Mupirocin-Salben werden in der Humanmedizin für die nasale Dekolonisierung und Sanierung von MRSA-Patienten genutzt (FULHAM et al., 2011). In der Tiermedizin wird Mupirocin häufig für die Behandlung von lokalisierten oberflächlichen Pyodermien eingesetzt. Hund Nr. 1850 wurde mehrfach über mehrere Wochen mit Mupirocin-Salbe behandelt. Aufgrund der großen Bedeutung von Mupirocin bei der Behandlung von MRSA-Infektionen des Menschen sollte Mupirocin in der Tiermedizin nur sehr restriktiv verwendet werden.

Für die MRSH-Stämme von Proben Nr. 279, 818 und 4384 konnte eine Erythromycin-Resistenz festgestellt werden, wobei keine Resistenz gegenüber Clindamycin vorlag. Dies erklärt sich durch den genotypischen Nachweis des *msrA*-Gens, welches eine Makrolid-, aber keine Lincosamid-Resistenz vermittelt.

Das *qacA*-Gen, welches in allen MRSH-Isolaten nachgewiesen werden konnte, vermittelt eine Resistenz gegenüber häufig verwendeten Desinfektionsmitteln wie Biguaniden und quarternäre Ammoniumverbindungen. Daher besteht die Möglichkeit, dass solche Stämme, wie bereits in anderen Studien gezeigt wurde, lange in der Klinik-Umgebung überleben (SAIDA et al., 2009). Weiterhin sind antimikrobielle Wirkstoffe wie Chlorhexidin in Shampoos enthalten, welche häufig für die Behandlung von oberflächlichen Pyodermien eingesetzt werden. MRSH-Stämme mit *qacA*-Gen können daher auf der Haut eines mit einem antimikrobiellen Shampoo behandelten Hundes überleben.

Die MRSA-Isolate von Proben Nr. 1015 wiesen vergleichsweise geringe Resistenzen gegenüber den getesteten Antibiotika auf, so dass bei diesem Hund noch mehrere Antibiotikatherapie-Optionen zur Verfügung standen.

### 2.3. Genotypisierungen

Molekularbiologische Charakterisierungen wie die *spa*-Typisierung, die

Makrorestriktionsanalyse oder die Microarray-basierte SCC*mec*-Typisierung wurden durchgeführt, um verifizieren zu können, dass Hund und jeweiliger Besitzer denselben Stamm trugen.

Da bei den Hunde-Besitzer-Paaren jeweils der gleiche *spa*-Typ und ein identisches Bandenmuster bei der Makrorestriktionsanalyse nachgewiesen werden konnte, ist davon auszugehen, dass eine Übertragung der MRSP-Stämme zwischen Hund und Besitzer stattgefunden hat. Aufgrund der Häufigkeit des MRSP-Vorkommens bei Hunden und des seltenen Vorkommens beim Menschen kann von einer Übertragung vom Hund auf den Menschen ausgegangen werden.

Die *spa*-Typisierung der MRSP-Stämme ergab die *spa*-Typen t02 und t06, welche auch in einer anderen Studie als die häufigsten *spa*-Typen nachgewiesen werden konnten (PERRETEN et al., 2010). Die *spa*-Typen t02 und t06 unterscheiden sich nur in der Deletion bzw. Duplikation eines Repeats (s. Abb. IV-2, Seite 78), so dass auch das gleichzeitige Vorkommen von t02 und t06 bei den MRSP-Isolaten der Hunde 126 und 3734 durch ein einzelnes genetisches Ereignis erklärt werden kann. Bei Proben Nr. 3734 konnten entsprechend dem Vorkommen der *spa*-Typen t02 und t06 bei der Makrorestriktionsanalyse mit anschließender PFGE unterschiedliche Bandenmuster beobachtet werden. Für die MRSP-Isolate von Proben Nr. 126 konnte auch bei wiederholter Versuchsdurchführung kein unterschiedliches Bandenmuster beobachtet werden (s. Abb. IV-4, Seite 80). Weitere Eigenschaften der MRSP-Stämme von Proben Nr. 3734 und 126 müssten verglichen werden, um die Möglichkeit des gleichzeitigen Vorkommens zweier verschiedener MRSP-Stämme näher untersuchen zu können. Die MRSP-Stämme von Proben Nr. 4430 und 4489 unterschieden sich bei der Makrorestriktionsanalyse nur durch eine Bande. Auch bei der Empfindlichkeitsbestimmung und Analyse der Resistenzgene war nur die An- bzw. Abwesenheit eines *cat*-Gens und die damit verbundene Chloramphenicol-Resistenz unterschiedlich (s. Tabelle IV-6, Seite 70 und IV-9, Seite 75). Unterschiede von nur einer Bande bzw. von nur einem Resistenzgen lassen eine Verwandtschaft zwischen den Stämmen vermuten (TRINDADE et al., 2003). Die Hunde sowohl von Proben Nr. 126 und 3734 als auch von 4430 und 4489 stammten aus München oder dem Münchener Umland. Sie wurden in einem vier- bzw. zwölf-monatigen Abstand in der Dermatologischen Abteilung der Medizinischen Kleintierklinik vorgestellt. Die Hunde von Proben Nr. 4430 und



4489 wurden kurz vor der Erstvorstellung in der dermatologischen Abteilung stationär in zwei unterschiedlichen Tierkliniken behandelt. Es könnte sich daher um MRSP-Klone handeln, welche in der Münchener Umgebung präsent sind. Weiterhin könnte es sich um Tierklinik-assoziierte MRSP-Klone handeln, welche ähnlich den HA-MRSA in der Humanmedizin im Krankenhaus bzw. in der Tierklinik erworben werden. Weitere Studien zum Vorhandensein von Tierklinik-assoziierten MRSP-Klonen werden benötigt.

Keiner der mit MRSP, MRSH oder mRSP kolonisierten Besitzer war zum Zeitpunkt der Probenentnahme erkrankt. Die bisher veröffentlichten Fallberichte über MRSP-Infektionen beim Menschen deuten darauf hin, dass vor allem immunsupprimierte Patienten von einer MRSP-Infektion betroffen sein können (KEMPKER et al., 2009; STEGMANN et al., 2010).

Bei zwei MRSH-Fällen war der Besitzer mit MRSH besiedelt. Die Makrorestriktionsanalyse der MRSH-Stämme ergab gleiche Bandenmuster bei beiden Hunden-Besitzerpaaren, so dass von einer Übertragung zwischen Hund und Besitzer ausgegangen werden kann. Hierbei könnte eine MRSH-Übertragung vom Besitzer auf den Hund stattgefunden haben, da beim Menschen *S. haemolyticus*-Isolate sehr häufig nachgewiesen werden können (SIERADZKI et al., 1998; FALCONE et al., 2006). Andererseits könnte es sich auch um eine Übertragung vom Hund auf den Besitzer handeln, da *S. haemolyticus* ebenso zur kutanen Mikroflora beim Hund gehört. LILENBAUM et al. (2000) konnte MRSH bei der Ohrinfektion eines Hundes nachweisen. Zwei Hunde wiesen eine lokalisierte MRSH-Besiedlung auf, wobei bei den Besitzern kein MRSH nachgewiesen werden konnte. Eine mögliche Erklärung wäre die Übertragung von MRSH auf den Hund über eine andere nicht getestete Person des jeweiligen Haushaltes. Als weitere Übertragungsquelle kämen die Geräte oder Gebrauchsmaterialien der Tierklinik in Frage, da insbesondere MRSH häufig Desinfektionsmittelresistenzen aufweist und daher zum Teil sehr lange in einer Klinik überleben kann (SAIDA et al., 2009). Weitere Studien über tierassoziierte Bakterienstämme mit Desinfektionsmittelresistenzen und deren Vorkommen in der Umgebung einer Tierklinik sind nötig.

Bei allen vier MRSH-Fällen konnte als primärer Erreger der Haut- oder Ohrinfektion *S. pseudintermedius* oder *Ps. aeruginosa* nachgewiesen werden. Die gezielte Antibiotikatherapie allein gegen diese Erreger brachte jedoch keinen

Erfolg und führte vermutlich dazu, dass MRSH sich weiter vermehren konnte und die Hautinfektion aufrecht erhielt.

Bei allen Besitzern, die eine Besiedlung mit MRSP oder MRSH der Nasenschleimhaut aufwiesen, konnte in jedem Fall MRSP oder MRSH auch an den Händen nachgewiesen werden. Dies legt Rückschlüsse auf den möglichen Übertragungsweg und wichtige Präventionsmaßnahmen nahe. Eine entsprechende Händehygiene von Besitzer und Tierarzt stellt daher die wichtigste vorbeugende Maßnahme zum Schutz gegen eine Übertragung von multiresistenten Staphylokokken dar. Die Besitzerinformation über regelmäßige Händehygiene und die Vermeidung eines engen Hund-Besitzer-Kontaktes bei Vorliegen einer Infektion mit multiresistenten Staphylokokken stellt daher eine essentielle Präventionsmaßnahme dar.

Die mRSP wurden in diese Studie aufgenommen, da sie Mehrfachresistenzen gegen Antibiotika aufwiesen, wenn auch keine Methicillin-Resistenz vorlag. Aktuelle Studien fokussieren sich vor allem auf Methicillin-resistente Staphylokokken. Multiresistente Staphylokokken ohne *SCCmec* sind jedoch ebenso bedeutsam, da die Therapie einer Infektion deutlich erschwert sein kann.

Lediglich ein Hund (Nr. 1015) wies eine MRSA-Hautinfektion auf, wobei der Besitzer sowie andere Personen des Haushaltes nicht mit MRSA kolonisiert waren. Der Ursprung der MRSA-Infektion konnte nicht abschließend geklärt werden. Möglich wäre eine MRSA-Übertragung über andere Kontaktpersonen oder -hunde. Das vergleichsweise geringe Vorkommen von MRSA im Gegensatz zu MRSP beim Hund konnte in dieser Studie bestätigt werden.

Die Microarray-basierte *SCCmec*-Typisierung der MRSA-Stämme ergab den *SCCmec*-Typ IV, welcher häufig mit dem Vorkommen eines „community acquired“ MRSA verbunden ist. Die Anwesenheit von *SCCmec* Typ IV deutet daher auf eine Übertragung vom Menschen auf den Hund hin. Die „community acquired“ MRSA weisen selten Resistenzen gegenüber Erythromycin, Clindamycin, Aminoglykosiden oder Tetracyklinen auf. Hingegen kann häufig als Virulenzfaktor das Panton-Valentin-Leukozidin nachgewiesen werden. Für die MRSA-Stämme von Proben Nr. 1015 konnte das Panton-Valentin-Leukozidin nicht nachgewiesen werden. Die *spa*-Typisierung der MRSA-Isolate ergab den *spa*-Typen t1214. Die globale Nachweishäufigkeit von *spa*-Typ 1214 liegt bei

0,10 % (Ridom Spa Server). Dieser *spa*-Typ wurde bereits in Kanada, Deutschland, Neuseeland, Schweiz und Großbritannien nachgewiesen.

Unabhängig von den MRSP, MRSH, mRSP oder MRSA-Fällen konnten regelmäßig MRSE bei den Besitzern nachgewiesen werden. Dieser Befund stimmt mit humanmedizinischen Studien überein (HU et al., 1995; DIEKEMA et al., 2001). Bedeutung erhält der Nachweis von MRSE durch die Möglichkeit der Übertragung von Resistenzgenen über Plasmide oder Transposons auf MRSA oder MRSP, wodurch neue Resistenztypen entstehen können (HANSEN & ERICSON SOLLID, 2006). Die Behandlung von Infektionen, welche durch multiresistente Erreger mit neuen Resistenztypen verursacht sind, ist zum Teil erschwert, da sowohl die gängigen Antibiotika als auch einige Reserveantibiotika keine Wirkung mehr zeigen. Die Entwicklung von neuen antimikrobiellen Wirkstoffen ist langwierig, und häufig nicht erfolgreich, da kaum neue Antibiotika-Angriffsstellen innerhalb eines Bakteriums detektiert werden (LOWY, 2003).

In dieser Studie konnte die Übertragung multiresistenter Staphylokokken zwischen Hund und Besitzer nachgewiesen werden. Daher sollte bei jedem Nachweis von multiresistenten Staphylokokken beim Hund eine ausführliche Besitzerinformation und -beratung über mögliche Risiken der Übertragung, insbesondere bei immunsupprimierten Besitzern, durchgeführt werden. Besitzer, welche stationär in eine Klinik aufgenommen oder operiert werden, sollten vorher den zuständigen Arzt über die Möglichkeit einer Besiedlung mit multiresistenten Staphylokokken informieren.

Für Tierkliniken ist ein adäquates Hygienemanagement in Kombination mit Screeningsuntersuchungen, insbesondere von Tieren, welche stationär in die Klinik aufgenommen werden, anzuraten. Weiterhin sind der restriktive Antibiotika-Einsatz und die Orientierung an den Leitlinien für den sorgfältigen Umgang mit antibakteriell wirksamen Tierarzneimitteln (BUNDESTIERÄRZTEKAMMER, 2010) entscheidend, um einer weiteren Resistenzentwicklung entgegenzuwirken. Reserveantibiotika aus der Humanmedizin sollten nicht in der Tiermedizin eingesetzt werden. Die Kombination von Hygienemanagement, Screeninguntersuchungen und dem restriktiven Antibiotika-Einsatz kann die Weiterverbreitung resistenter Klone und die Entwicklung von Resistenzen beschränken.

## VI. ZUSAMMENFASSUNG

### **Lokalisation und Typisierung multiresistenter Staphylokokken bei Hunden mit Pyodermie und ihren Besitzern**

Die wachsende Resistenz von Krankheitserregern gegenüber Antibiotika ist weltweit eines der größten Probleme in Human- und Veterinärmedizin. Eine gestiegene Antibiotikaresistenz bei kaninen Staphylokokken konnte beobachtet werden (LLOYD, 2007). Das Risiko eine Kolonisierung mit multiresistenten Bakterien wird in der Öffentlichkeit wahrgenommen.

*Staphylococcus (S.) pseudintermedius* ist ein potentiell pathogenes Bakterium, welches zur normalen Hautflora beim Hund gehört, aber auch bei Haut- und Ohrinfektionen isoliert werden kann. Von der Übertragung Methicillin-resistenter *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP) zwischen Hund und Besitzer wurde bereits berichtet (KEMPKER et al., 2009; PAUL et al., 2011). Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) konnten von der Haut von gesunden Hunden und Hunden mit Hautinfektion isoliert werden (BOOST et al., 2008; GRIFFETH et al., 2008), eine Übertragung vom Besitzer auf den Hund wird vermutet (BOOST et al., 2008). Koagulase-negative Staphylokokken (KNS) wie *S. haemolyticus* und *S. epidermidis* gehören zur kutanen Mikroflora von Hund und Mensch. Weiterhin sind sie als Hauptpathogene für nosokomiale Infektionen des Menschen verantwortlich (STOCK, 2007)

Der Erwerb des *mecA*-Gens, welches für die Methicillin-Resistenz von MRSP, MRSA und MRSH verantwortlich ist, erfolgt über horizontalen Gentransfer der Staphylokokken-Chromosomen-Kassette *mec* (SCC*mec*). Das *mecA*-Gen kodiert für ein verändertes Penicillin-Bindeprotein (PBP) 2a mit einer niedrigeren Affinität gegenüber  $\beta$ -Laktam-Antibiotika. Weiterhin werden bei Methicillin-resistenten Staphylokokken oft zusätzliche Resistenzgene zusammen mit dem *mecA*-Gen oder unabhängig davon mittels Plasmiden oder Transposons übertragen. Die Ausbreitung von multiresistenten Staphylokokken erfolgt in der Regel über die Verbreitung von resistenten Klonen innerhalb einer Population. Daher sind Untersuchungen klonaler Zusammenhänge für die Epidemiologie resistenter Staphylokokken von zentraler Bedeutung (PERRETEN et al., 2010).

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit der Lokalisation multiresistenter Staphylokokken bei Hunden sowie mit der Übertragung entsprechender Stämme von Hunden auf die Besitzer.

In einer Vorstudie wurden kommerziell erhältliche Selektivmedien, welche für die Bestimmung von MRSA genutzt werden, auf ihre Eignung für die Detektion von MRSP untersucht. Die folgenden Medien wurden in verschiedenen Inokulationsversuchen untersucht: ChromID MRSA Agar (bioMérieux, Nürtingen, Germany), Oxacillin resistance screening agar base (ORSAB; Oxoid Limited, Basingstoke, England), Chrom MRSA II Agar (BD Diagnostics, Heidelberg, Germany) und Brilliance MRSA Agar (Brilliance; Oxoid Limited, Basingstoke, England). Brilliance und ORSAB waren für die Detektion von MRSP am besten geeignet. In der Hauptstudie wurde ORSAB für die Detektion von MRSP genutzt.

In die Hauptstudie wurden 27 Hunde mit rezidivierender oder nicht responsiver Pyodermie eingeschlossen. Proben von verschiedenen Körperstellen des Hundes und des Besitzers wurden auf multiresistente Staphylokokken untersucht. Von den 17 Hunden mit multiresistenten Staphylokokken konnten MRSP bei neun Hunden (53 %) nachgewiesen werden. MRSH wurden von vier Hunden (24 %) isoliert und MRSA konnten bei einem Hund (5,9 %) nachgewiesen werden. Multiresistente *S. pseudintermedius* (mRSP) ohne *mecA*-Gen konnten bei drei Hunden detektiert werden (17 %). In zwei MRSP-Fällen waren auch die Besitzer mit MRSP kolonisiert. Bei einem hospitalisierten Fall mit MRSP konnte das Bakterium in der Nase eines Tierarztes bis zu einer Woche nach Patientenkontakt nachgewiesen werden. Bei zwei MRSH-Fällen mit generalisierter Pyodermie waren die Besitzer ebenfalls mit MRSH kolonisiert. Die Besitzer von Hunden mit lokalisierter MRSH-Infektion waren nicht mit MRSH besiedelt. Bei allen mRSP-Fällen waren die Besitzer auch mit mRSP besiedelt. Der Besitzer des Hundes mit MRSA-Infektion wies mit MRSA kontaminierte Hände auf. Es konnte jedoch keine Besiedlung der Nase mit MRSA nachgewiesen werden.

Die Antibiotikaresistenzprofile der isolierten Staphylokokkenstämme wurden mittels Bouillon-Mikrodilution, Agardiffusionstest und Microarray-basierter Detektion der Resistenzgene untersucht. Alle multiresistenten Staphylokokken wiesen eine Resistenz gegenüber mehr als drei Antibiotikaklassen auf. Bei einem MRSP-Fall konnte eine Resistenz gegenüber Mupirocin nachgewiesen werden;

dies wurde in der Literatur bisher sehr selten beschrieben. Genotypisch konnte für alle MRSH-Fälle eine Resistenz gegenüber Desinfektionsmitteln gezeigt werden. Aufgrund der unterschiedlichen Resistenzprofile der nachgewiesenen klinischen Stämme mit zum Teil nur noch wenigen wirksamen Antibiotika erscheint bei Fällen der rezidivierenden Pyodermie des Hundes eine bakteriologische Untersuchung mit anschließender Empfindlichkeitsbestimmung unbedingt erforderlich. Antibiotika wie Mupirocin, welche in der Humanmedizin für die nasale Dekolonisierung von MRSA genutzt und benötigt werden, sollten nur sehr restriktiv in der Tiermedizin eingesetzt werden. Die bestimmte Desinfektionsmittelresistenz bei MRSH-Stämmen ist ein bekanntes Problem in der Humanmedizin. Die Resistenzlage gegenüber Desinfektionsmitteln sollte in der Tiermedizin verstärkt beobachtet werden.

Die genetische Verwandtschaft der MRSP-, MRSH- und MRSA-Stämme wurde mittels Microarray-basierter *SCCmec*-Typisierung, Makrorestriktionsanalyse mit anschließender Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) und *spa*-Typisierung untersucht. Bei jedem Hunde-Besitzer-Paar konnten jeweils der gleiche *spa*-Typ und identische Bandenmuster in der PFGE nachgewiesen werden. Bei der *SCCmec*-Typisierung des MRSA-Stamms konnte der *SCCmec*-Typ IV bestimmt werden.

Die Bedeutung der MRSP-Besiedlung beim Menschen ist bisher nicht geklärt. Die in dieser Studie untersuchten Besitzer waren nicht erkrankt. Fallberichte über MRSP-Infektionen beim Menschen konnten ein höheres Risiko für immunsupprimierte Menschen feststellen (KEMPKER et al., 2009; STEGMANN et al., 2010).

In dieser Studie konnte die Übertragung multiresistenter Staphylokokken zwischen Hund und Besitzer nachgewiesen werden. Eine Übertragung scheint wahrscheinlicher zu sein, wenn eine generalisierte Kolonisierung mit multiresistenten Staphylokokken vorliegt.

## VII. SUMMARY

### **Localisation and typing of multiresistant staphylococci in dogs and their owners**

The increasing antibiotic resistance is one of the most important problems in medicine all over the world. An increasing resistance among canine staphylococci has been recognized (LLOYD, 2007). The risk of colonisation with multiresistant bacteria is noticed.

*S. pseudintermedius* is a potential bacterial pathogen that is a part of the dog's normal cutaneous flora, but can be also isolated from canine skin lesions and infected ears. Several case reports about a transmission of Methicillin resistant *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP) between dogs and humans have been published (KEMPKER et al. 2009; PAUL et al. 2011). Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) has been isolated from healthy dogs and dogs with skin diseases (BOOST et al. 2008; GRIFFETH et al. 2008). Humans are frequently colonized with MRSA. Therefore, transmission between dogs and their owners is possible and probably the owners infect their dogs (Boost et al. 2008). Coagulase negative staphylococci (CNS) like *S. haemolyticus* and *S. epidermidis* belong to the normal cutaneous flora of humans and dogs, but have been also recognized as the main pathogen of nosocomial infections in humans (STOCK, 2007).

MRSP, MRSA and MRSH acquire the *mecA* gene by horizontal gene transfer via *staphylococcus chromosome cassette mec* (SCCmec). This mobile gene cassette can be transferred between different staphylococcal populations and integrated into the bacterial chromosome. The *mecA* gene encodes an altered penicillin binding protein (PBP) 2a with a very low affinity for  $\beta$ -lactam antibiotics. Furthermore, bacteria often acquire additional resistance genes, either along with the *mecA* gene, or on plasmids or transposons. MRSP, MRSA and MRSH are thus also frequently resistant against other classes of antibiotics. Proliferation of resistant clones is important for the spread of multiresistant staphylococci, the examination of clonal coherences is therefore of major relevance for the epidemiology of multiresistant staphylococci (PERRETEN et al., 2010).



This study evaluated the localisation and transmission of multiresistant staphylococci between dogs and their owners.

In a preliminary study commercially available MRSA selective media were evaluated for the detection of MRSP. Media selective for MRSP are currently not available. The following media were tested in various inoculation assays: ChromID MRSA Agar (bioMérieux, Nürtingen, Germany), Oxacillin resistance screening agar base (ORSAB; Oxoid Limited, Basingstoke, England), Chrom MRSA II Agar (BD Diagnostics, Heidelberg, Germany) and Brilliance MRSA Agar (Brilliance; Oxoid Limited, Basingstoke, England). Brilliance and ORSAB were found to be the most suitable media for the detection of MRSP. ORSAB was used in the main study for the detection of MRSP.

In the main part of the study 27 dogs with recurrent or nonresponsive pyoderma or otitis were included. The diagnosis of pyoderma was based on patients history, clinical signs and in-house cytology. Seventeen dogs had multiresistant staphylococci. Different regions of the body of the dog were sampled, and the owners were also tested for multiresistant staphylococci. Of the seventeen dogs, MRSP was isolated from nine, MRSH from four and MRSA from one dog. Multiresistant *S. pseudintermedius* (mRSP) without *mecA* gene were detected from three dogs. Two owners of the dogs with MRSP were also colonized with MRSP. In one hospitalized MRSP case a veterinarian was sampled. MRSP was detected in the nares of the veterinarian until one week after contact with the dog. In two MRSH cases with generalized pyoderma the owners were also colonized with MRSH. No owners from dogs with localised MRSH infections were colonized. All owners of dogs with mRSP were positive. The owner of the dog with MRSA had a MRSA contamination of the hands but no colonization was detected.

Antibiotic sensitivity of all strains was determined by broth microdilution, disk diffusion test and microarray based detection of resistance genes. All multiresistant staphylococci showed resistance against more than three antibiotic classes. For one MRSP resistance against mupirocin was demonstrated. Resistance against disinfectants was shown for all MRSH cases.

Due to the various resistance profiles of the strains with few effective antibiotics, bacterial culture is required for the right choice of antibiotics. Antibiotics like



mupirocin, which is used in human medicine for the nasal decolonization of MRSA, should be used very restrictively in veterinary medicine. The detected disinfectant resistance of MRSH is a known problem in human medicine and should be closely monitored in veterinary medicine.

In order to evaluate the genetic relatedness between MRSP, MRSH and MRSA strains, respectively, a microarray-based *SCCmec* typing, macrorestriction with pulsed field gelelectrophoresis (PFGE) and a *spa* typing was used. For each dog-owner-pair the same *spa* type and identical band patterns in PFGE were determined. *SCCmec* typing of the MRSA strains revealed the *SCCmec* type IV.

The relevance of human MRSP colonisation is not resolved yet. In this study none of the owners were diseased. Case reports about human MRSP infections showed a higher risk of infection for immunocompromised patients (KEMPKER et al., 2009; STEGMANN et al., 2010).

In this study, transmission of multiresistant staphylococci between dogs and their owners was documented. The transmission seems more likely with generalized compared to localized infections.

## VIII. LITERATURVERZEICHNIS

Aires de Sousa M, de Lencastre H. Bridges from hospitals to the laboratory: genetic portraits of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones. FEMS Immunol Med Microbiol 2004; 40:101-111.

Al-Talib H, Yean CY, Al-khateeb A, Singh KKB, Hasan H, Al-Jashamy K, Ravichandran M. Comparative Evaluation of Five Culture Media with Triplex PCR Assay for Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. Curr Microbiol 2010; 61: 1-6.

Aly R, Bibel DJ. Adherence of skin micro-organisms and the development of skin flora from birth. Noble WC, editor. The skin Microflora and Microbial Skin Disease. Cambridge: Cambridge University Press; 1993.

Ammon A, Gastmeier P, Weist K, Kramer MH, Petersen LR. Empfehlung zur Untersuchung von Ausbrüchen nosokomialer Infektionen (Erläuterungen des Robert Koch-Institutes). RKI-Heft 2001; 21: 1-43.

Annear DI. The effect of temperature on resistance of *Staphylococcus aureus* to methicillin and some other antibiotics. Med J Aust 1968; 1: 444-6.

Bannoehr J, Zakour NLB, Waller AS, Guardabassi L, Thoday KL, van der Broek AHM, Fitzgerald JR. Population genetic structure of the *Staphylococcus intermedius* group: Insights into *agr* diversification and the emergence of methicillin-resistant strains. J Bacteriol 2007; 189: 8685-8692.

Bannoehr J, Franco A, Iurescia M, Battisti A, Fitzgerald JR. Molecular diagnostic identification of *Staphylococcus pseudintermedius*. J Clin Microbiol 2009; 47(2): 469-471.

Barry T, Powell R, Gannon F. A general method to generate DNA probes for microorganisms. Biotechnology 1990; 8: 233-236.

Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am J Clin Pathol 1996; 45: 493-496.

Bemis DA, Jones RD, Frank LA, Kania SA. Evaluation of Susceptibility Breakpoints Used to Predict *mecA* mediated Resistance in *Staphylococcus pseudintermedius* Isolated from Dogs. J Vet Diagn Invest 2009; 21: 53-58.

Bergeron J, Ammirati M, Danley D, James L, Norcia M, Retsema J, Strick CA, Su WG, Sutcliffe J, Wondrack L. Glycylcyclines bind to the high-affinity tetracycline ribosomal binding site and evade *Tet(M)*- and *Tet(O)*-mediated ribosomal protection. Antimicrob Agents Chemother 1996; 40: 2226-2228.

Berglund C, Ito T, Ikeda M, Ma XX, Söderquist B, Hiramatsu K. Novel type of staphylococcal cassette chromosome *mec* in a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain isolated in Sweden. Antimicrob Agents Chemother 2008; 52: 3512–3516.

Besier S, Ludwig A, Brade V, Wichelhaus TA. Molecular analysis of fusidic acid resistance in *Staphylococcus aureus*. Mol Microbiol 2003; 47: 463–469.

Bhakdi S, Trantum-Jensen J. Alpha-Toxin of *Staphylococcus aureus*. Microbiol Rev 1991; 55: 733-751.

Biavasco F, Vignaroli C, Varaldo PE. Glycopeptide resistance in coagulase-negative staphylococci. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2000; 19: 403–417.

Black CC, Solyman SM, Eberlein LC, Bemis DA, Woron AM, Kania SA. Identification of a predominant multilocus sequence type, pulsed-field gel electrophoresis cluster, and novel staphylococcal chromosomal cassette in clinical isolates of *mecA*-containing, methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. Vet Microbiol 2009; 139: 333–338.

Black CC, Eberlein LC, Solyman SM, Wilkes RP, Hartmann FA, Rohrbach BW, Bemis DA, Kania SA. The role of *mecA* and *blaZ* regulatory elements in *mecA* expression by regional clones of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. Vet Microbiol 2011; 151: 345–353.

Boerlin P, Burnens AP, Frey J, Kuhnert P, Nicolet J. Molecular epidemiology and genetic linkage of macrolide and aminoglycoside resistance in *Staphylococcus intermedius* of canine origin. Vet Microbiol 2001; 79: 155-169.

Boerlin P, Kuhnert P, Hüsey D, Schaellibaum M. Methods for Identification of *Staphylococcus aureus* Isolates in Cases of Bovine Mastitis. J Clin Microbiol 2003; 41: 767-771.

Boost M, O'Donoghue M, James A. Investigation of the role of dogs as reservoirs of *Staphylococcus aureus* and the transmission of strains between pet owners and their dogs. Hong Kong Med J 2008; 14 (5 Suppl): 15-18.

Brown DF, Edwards DI, Hawkey PM, Morrison D, Ridgway GL, Towner KJ, Wren MW. Guidelines for the laboratory diagnosis and susceptibility testing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). J Antimicrob Chemother 2005; 56: 1000-1018.

Bundestierärztekammer. Leitlinien für den sorgfältigen Umgang mit antibakteriell wirksamen Tierarzneimitteln. Schlütersche Verlagsgesellschaft, Hannover. Beilage zum Deutschen Tierärzteblatt 2010; 3.

Burdett V. Tet(M)-promoted release of tetracycline from ribosomes is GTP dependent. Journal of Bacteriology 1996; 178: 3246–3251.

Burns K, Cannon M, Cundliffe E. A resolution of conflicting reports concerning the mode of action of fusidic acid. FEBS Lett 1974; 40: 219-23.

Cai Y, Wang R, Liang B, Bai N, Liu Y. Systematic review and meta-analysis of the effectiveness and safety of tigecycline for treatment of infectious disease. Antimicrob Agents Chemother 2011; 55: 1162-1172.

Carbonnelle E, Mesquita C, Bille E, Day N, Dauphin B, Beretti JL, Ferroni A, Gutmann L, Nassif X. MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory. Clin Biochem 2011; 44: 104–109.

Carbonnelle E, Beretti JL, Cottyn S, Quesne G, Berche P, Nassif X, Ferroni A. Rapid Identification of Staphylococci Isolated in Clinical Microbiology Laboratories by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. J Clin Microbiol 2007; 45: 2156-2161.

Castanheira M, Watters AA, Bell JM, Turnidge JD, Jones RN. Fusidic acid resistance rates and prevalence of resistance mechanisms among *Staphylococcus* spp. isolated in North America and Australia, 2007-2008. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 3614-3617.

Cauwelier B, Gordts B, Descheemaeker P, Van Landuyt H. Evaluation of a disk diffusion method with cefoxitin (30 microg) for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2004; 23: 389-392.

Chiew YF, Charles M, Johnstone MC, Thompson KM, Parnell KD, Penno EC. Detection of vancomycin heteroresistant *Staphylococcus haemolyticus* and vancomycin intermediate resistant *Staphylococcus epidermidis* by means of vancomycin screening agar. *Pathology*. 2007; 39: 375-377.

Chopra I, Roberts M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev* 2001; 65: 232–260.

Chuang CY, Yang YL, Hsueh PR, Lee PI. Catheter-related bacteremia caused by *Staphylococcus pseudintermedius* refractory to antibiotic-lock therapy in a hemophilic child with dog exposure. *J Clin Microbiol* 2010; 48: 1497-1498.

Cilia V, Lafay B, Christen R. Sequence heterogeneities among 16S ribosomal RNA sequences, and their effect on phylogenetic analyses at the species level. *Mol Biol Evol* 1996; 13: 451-461.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria isolated From Animals: Third Edition: Approved Standard M31-A3. Wayne, PA, USA. 2008: CLSI.

Cobb MA, Edwards HJ, Jagger TD, Marshall J, Bowker KE. Topical fusidic acid/betamethasone-containing gel compared to systemic therapy in the treatment of canine acute moist dermatitis. *Vet J* 2005; 169: 276–280.

Coia JE, Duckworth GJ, Edwards DI et al. Guidelines for the control and prevention of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in healthcare facilities. *J Hosp Infect* 2006; 63 Suppl 1: 1–44.

De Boer DJ. Strategies for management of recurrent pyoderma in dogs. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1990; 20: 1509-1524.

Decristophoris P, Fasolad A, Benaglia C, Tonollaa M, Petrini O. Identification of *Staphylococcus intermedius* Group by MALDI-TOF MS. *Syst Appl Microbiol* 2011; 34: 45–51.

Descoux S, Rossano A, Perreten V. Characterization of new staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) and topoisomerase genes in fluoroquinolone- and methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 1818–1823.

Deurenberg RH, Stobberingh EE. The evolution of *Staphylococcus aureus*. *Infect Genet Evol* 2008; 8: 747-763.

Devriese LA, Vancanneyt M, Baele M, Vaneechoutte M, de Graef E, Snauwaert C, Cleenwerck I, Dwyndt P, Swings J, Decostere A, Haesebrouck F. *Staphylococcus pseudintermedius* sp. nov., a coagulase-positive species from animals. *Int J Syst Evol Microbiol* 2005; 55: 1569–1573.

De Vos P, Garrity G, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, Schleifer KH, Whitman WB. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Vol. 3: The Firmicutes*. New York: Springer Verlag. 2009: 392-421.

Diekema DJ, Pfaller MA, Schmitz FJ, Smayevsky J, Bell J, Jones RN, Beach M; SENTRY Participants Group. Survey of infections due to *Staphylococcus* species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997–1999. *Clin Infect Dis* 2001; 32: 114–132.

Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13: 16-34.

Dowling PM. Antimicrobial therapy of skin and ear infections. *Can Vet J* 1996; 37: 695-699.

Drinkovic D, Fuller ER, Shore KP, Holland DJ, Ellis-Pegler R. Clindamycin treatment of *Staphylococcus aureus* expressing inducible clindamycin resistance. *J Antimicrob Chemother* 2001; 48: 315-316.

Drlica K, Zhao X. DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiol Mol Biol Rev* 1997; 61: 377-392.

Dubois D, Leyssene D, Chacornac JP, Kostrzewa M, Schmit PO, Talon R, Bonnet R, Delmas J. Identification of a Variety of *Staphylococcus* Species by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. *J Clin Microbiol* 2010; 48: 941-945.

Dyke KGH, 1997. Resistance to b-lactam antibiotics: resistance mediated by b-lactamases. In: Crossley, K.B., Archer, G.L. (Eds.), *The Staphylococci in Human Diseases*. Churchill Livingstone Inc., New York. 1997: 139–157.

Enright MC, Robinson DA, Randle G, Feil EJ, Grundmann H, Spratt BG. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 99: 7687-7692.

Everett MJ, Piddock LJV. Mechanisms of resistance to fluoroquinolones. In Kuhlmann J, Dalhoff A, Zeiler HJ, eds. *Quinolone Antibacterials*. Springer Verlag, Berlin, Germany. 1998; 259-296.

Faires MC, Traverse M, Tater KC, Pearl DL, Weese JS. Methicillin-resistant and -susceptible *Staphylococcus aureus* infections in dogs. *Emerg Infect Dis*. 2010; 16: 69-75.

Falcone M, Giannella M, Raponi G, Mancini C, Venditti M. Teicoplanin use and emergence of *Staphylococcus haemolyticus*: is there a link? *Clin Microbiol Infect* 2006; 12: 96-97.

Farmer TH, Gilbert J, Elson SW. Biochemical basis of mupirocin resistance in strains of *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 1992; 30: 587–596.

Favre B, Hugonnet S, Correa L, Sax H, Rohner P, Pittet D. Nosocomial bacteremia: clinical significance of a single blood culture positive for coagulase-negative staphylococci. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2005; 26: 697-702.

Fazakerley J, Nuttall T, Sales D, Schmidt V, Carter SD, Hart CA, McEwan NA. Staphylococcal colonization of mucosal and lesional skin sites in atopic and healthy dogs. *Vet Dermatol* 2009; 20: 179-184.

Feßler AT, Carmen Billerbeck C, Kadlec K, Schwarz S. Identification and characterization of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from bovine mastitis. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65: 1576–1582.

Figeys D. Array and lab on a chip technology for protein characterization.

*Curr Opin Mol Ther* 1999; 1: 685-694.

Finck-Barbancon V, Duportail G, Meunier O, Colin DA. Pore formation by a two-component leukocidin from *Staphylococcus aureus* within the membrane of human polymorphonuclear leukocytes. *Biochim Biophys Acta* 1993; 1182: 275-282.

Fine JD. Structure and antigenicity of the skin basement membrane. *J Cutan Pathol* 1991; 18: 401-409.

Fitzgerald JR. The *Staphylococcus intermedius* group of bacterial pathogens: species reclassification, pathogenesis and the emergence of methicillin resistance. *Vet Dermatol* 2009; 20: 490-495.

Foster AP. Immunomodulation and immunodeficiency. *Vet Dermatol* 2004; 15: 115–126.

Foster TJ. Colonization and infection of the human host by staphylococci: adhesion, survival and immune evasion. *Vet Dermatol* 2009; 20: 456-470.

Forster T, Roy D, Ghazal P. Experiments using microarray technology: limitations and standard operating procedures. *J Endocrinol* 2003; 178: 195–204.

Frank LA, Kania SA, Kirzeder EM, Eberlein LC, Bemis DA. Risk of colonization or gene transfer to owners of dogs with methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. *Vet Dermatol* 2009; 20: 496-501.

French GL. Methods for screening for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriage. *Clin Microbiol Infect* 2009; 15: 10-16.

Fuda CC, Fisher JF, Mobashery S. Beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus*: the adaptive resistance of a plasmid genome. *Cell Mol Life Sci* 2005; 62: 2617-2633.



Fulham KS, Lemarie SL, Hosgood G, Dick HLN. In vitro susceptibility testing of meticillin-resistant and meticillin-susceptible staphylococci to mupirocin and novobiocin. *Vet Dermatol* 2011; DOI: 10.1111/j.1365-3164.2010.00921.x.

Gale EF, Cundliffe E, Reynolds P E, Richmond MH, Waring MJ. *The Molecular Basis of Antibiotic Action*, 2nd ed. London: John Wiley & Sons. 1981: 402.

Ganiere JP, Medaille C, Mangion C. Antimicrobial drug susceptibility of *Staphylococcus intermedius* clinical Isolates from canine pyoderma. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 2005; 52: 25–31.

Garneau P, Labrecque O, Maynard C, Messier S, Masson L, Archambault M, Harel J. Use of a Bacterial Antimicrobial Resistance Gene Microarray for the Identification of Resistant *Staphylococcus aureus*. *Zoonoses Public Health* 2010; 57: 94–99.

Garza-González E, López D, Pezina C, Muruet W, Bocanegra-García V, Muñoz I, Ramirez C. Diversity of staphylococcal cassette chromosome *mec* structures in coagulase-negative staphylococci and relationship to drug resistance. *J Med Microbiol* 2010; 59: 323-329.

Gemmell CG, Roberts E. 1973. Toxins and enzymes of coagulase-negative staphylococci isolated from human infections. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol* 1973; 18: 276-280.

Geoghegan JA, Smith EJ, Speziale P, Foster TJ. *Staphylococcus pseudintermedius* expresses surface proteins that closely resemble those from *Staphylococcus aureus*. *Vet Microbiol* 2009; 138: 345-352.

Ghebremedhin B, Layer F, König W, König B. Genetic Classification and Distinguishing of *Staphylococcus* Species Based on Different Partial *gap*, 16 S rRNA, *hsp60*, *rpoB*, *sodA*, and *tuf* Gene Sequences. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 1019-1025.

Gilbart J, Perry CR, Slocombe B. High-level mupirocin resistance in *Staphylococcus aureus*: evidence for two isoleucyl-tRNA synthetases. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37: 32-38.

Gottlieb S, Wigney DI, Martin PA, Norris JM, Malik R, Govendir M. Susceptibility of canine and feline *Escherichia coli* and canine *Staphylococcus intermedius* isolates to fluoroquinolones. Aust Vet J 2008; 86: 147-52.

Griffeth GC, Morris DO, Abraham JL, Shofer FS, Rankin SC. Screening for skin carriage of methicillin-resistant coagulase-positive staphylococci and *Staphylococcus schleiferi* in dogs with healthy and inflamed skin. 2008; 19; 142–149.

Grinius L, Drequiniene G, Goldberg EB, Liao CH, Projan SJ. A staphylococcal multidrug resistance gene product is a member of a new protein family. Plasmid 1992; 27: 119-129.

Guardabassi L, Loeber ME, Jacobson A. Transmission of multiple antimicrobial-resistant *Staphylococcus intermedius* between dogs affected by deep pyoderma and their owners. Vet Microbiol 2004; 98: 23-27.

Guardabassi L, Ghibaud G, Damborg P. In vitro antimicrobial activity of a commercial ear antiseptic containing chlorhexidine and Tris–EDTA. Vet Derm 2009; 21: 282–286.

Hájek V. *Staphylococcus intermedius*, a New Species Isolated from Animals. Int J Syst Bacteriol 1976; 26: 401-408.

Hanselman BA, Kruth S, Weese JS. Methicillin-resistant staphylococcal colonization in dogs entering a veterinary teaching hospital. Vet Microbiol 2008; 12: 277-281.

Hanselman BA, Kruth SA, Rousseau J, Weese. Coagulase positive staphylococcal colonization of humans and their household pets. Can Vet J 2009; 50: 954-958.

Hanssen AM, Ericson Sollid JU. SCCmec in staphylococci: genes on the move. FEMS Immunol Med Microbiol 2006; 46: 8-20.

Harvey RG, Noble WC. A temporal study comparing the carriage of *Staphylococcus intermedius* on normal dogs with atopic dogs in clinical remission. Vet Dermatol 1994; 5: 21-25.

Harvey RG, Lloyd DH. The distribution of bacteria (other than staphylococci and *Propionibacterium acnes*) on the hair, at the skin surface and within the hair follicles of dogs. *Vet Dermatol* 1995; 6: 79-84.

Heikens E, Fleer A, Paauw A, Florijn A, Fluit AC. Comparison of Genotypic and Phenotypic Methods for Species-Level Identification of Clinical Isolates of Coagulase-Negative Staphylococci. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 2286-2290.

Hendricks A, Schuberth HJ, Schueler K, Lloyd DH. Frequency of superantigen-producing *Staphylococcus intermedius* isolates from canine pyoderma and proliferation-inducing potential of superantigens in dogs. *Res Vet Sci* 2002; 73: 273-277.

Herrera L, Jimé'nez S, Valverde A, Garcia-Aranda MA, Sáez-Nieto JA. Molecular analysis of rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolated in Spain (1996–2001). Description of new mutations in the *rpoB* gene and review of the literature. *Int J Antimicrob Agents* 2003; 21: 403–8.

Heymann, DL (Ed.). *Control of Communicable Diseases in Man* (18th edition). American Public Health Association. 2004; 497-499.

Hill PB, Moriello KA. Canine pyoderma. *J Am Vet Med Assoc.* 1994; 204: 334-340.

Hodgson JE, Curnock SP, Dyke KG, Morris R, Sylvester DR, Gross MS. Molecular characterization of the gene encoding high-level mupirocin resistance in *Staphylococcus aureus* J2870. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38: 1205–1208.

Holden MTG, Feil EJ, Lindsay JA, Peacock SJ, Day NPJ, Enright MC, Foster TJ, Moore CE, Hurst L, Atkin R, Barron A, Bason N, Bentley SD, Chillingworth C, Chillingworth T, Churcher C, Clark L, Corton C, Cronin A, Doggett J, Dowd L, Feltwell T, Hance Z, Harris B, Hauser H, Holroyd S, Jagels K, James KD, Lennard N, Line A, Mayes R, Moule S, Mungall K, Ormond D, Quail MA, Rabbino-witsch E, Rutherford K, Mandy Sanders M, Sarah Sharp S, Simmonds M, Stevens K, Sally Whitehead S, Bart G. Barrell BG, Brian G. Spratt BG, Parkhill J. Complete genomes of two clinical *Staphylococcus aureus* strains: Evidence for the rapid evolution of virulence and drug resistance. *Proc Natl Acad Sci* 2004; 101: 9786-9791.

Holm BR, Rest JR, Seewald W. A prospective study of the clinical findings, treatment and histopathology of 44 cases of pyotraumatic dermatitis. *Vet Dermatol* 2004; 15: 369-376.

Hooper DC. Fluoroquinolone resistance among Gram-positive cocci. *Lancet Infect Dis* 2002; 2: 530–538.

Hu L, Umeda A, Amako K. Typing of *Staphylococcus epidermidis* colonizing in human nares by pulsed-field gel electrophoresis. *Microbiol Immunol*. 1995; 39: 315-319.

Huang MB, Gay ET, Baker CN, Banerjee SN, Tenover FC. Two percent sodium chloride is required for susceptibility testing of staphylococci with oxacillin when using agar-based dilution methods. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 2683–2688.

Hurdle JG, O'Neill AJ, Ingham E, Fishwick C, Chopra I. Analysis of mupirocin resistance and fitness in *Staphylococcus aureus* by molecular genetic and structural modelling techniques. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 4366–4376.

Ihrke PJ. Bacterial Skin Disease in the Dog: A Guide to Canine Pyoderma. Bayer AG Business Group Animal Health, Leverkusen. 1996

Intorre L, Vanni M, Di Bello D, Pretti C, Meucci V, Tognetti R, Soldani G, Cardini G, Jousson O. Antimicrobial susceptibility and mechanism of resistance to fluoroquinolones in *Staphylococcus intermedius* and *Staphylococcus schleiferi* *J vet Pharmacol Therap* 2007; 30: 464–469.

Ito T, Katayama Y, Asada K, Mori N, Tsutsumimoto K, Tiensasitorn C, Hiramatsu K. Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001; 45: 1323-1336.

Iyori K, Hisatsune J, Kawakami T, Shibata S, Murayama N, Ide K, Nagata M, Fukata T, Iwasaki T, Oshima K, Hattori M, Sugai M, Nishifuji K. Identification of a novel *Staphylococcus pseudintermedius* exfoliative toxin gene and its prevalence in isolates from canines with pyoderma and healthy dogs. *FEMS Microbiol Lett* 2010; 312: 169-175.

Jordens JZ, Hall LMC. Characterisation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates by restriction endonuclease digestion of chromosomal DNA. J Med Microbiol 1988; 27: 117-123.

Kadlec K, van Duijkeren E, Wagenaar JA, Schwarz S. Molecular basis of rifampicin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* isolates from dogs. J Antimicrob Chemother 2011; 66: 1236-1242.

Kahl BC, Mellmann A, Deiwick S, Peters G, Harmsen D. Variation of the polymorphic region X of the protein A gene during persistent airway infection in cystic fibrosis patients reflects two independent mechanisms of genetic change in *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 2005; 43:502-505.

Kania SA, Williamson NL, Frank LA, Wilkes RP, Jones RD, Bemis DA. Methicillin resistance of staphylococci isolated from the skin of dogs with pyoderma. Am J Vet Res. 2004; 65: 1265-1268.

Kasten MJ. Clindamycin, metronidazole, and chloramphenicol. Mayo Clin Proc 1999; 74: 825-833.

Kempker R, Mangalat D, Kongphet-Tran T, Eaton M. Beware of a pet dog: A case of *Staphylococcus intermedius* infection. Am J Med Sci 2009; 338(5): 425-427.

Kernodle DS, Stratton CW., McMurray LW, Chipley JR, McGraw PA. Differentiation of beta-lactamase variants of *Staphylococcus aureus* by substrate hydrolysis profiles. J Infect Dis 1989; 159: 103–108.

Klevens RM, Morrison MA, Nadle J, Petit S, Gershman K, Ray S, Harrison LH, Lynfield R, Dumyati G, Townes JM, Craig AS, Zell ER, Fosheim GE, McDougal LK, Carey RB, Fridkin SK; Active Bacterial Core surveillance (ABCs) MRSA Investigators. Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States. JAMA 2007; 298: 1763-1771

Kloos WE, Schleifer KH. Genus IV *Staphylococcus*. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 2, pp. Edited by Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, Holt JG. Baltimore, MD: Williams & Wilkins. 1986: 1013-1035.

Kluytmans J, van Belkum A, Verbrugh H. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. Clin Microbiol Rev 1997; 10: 505-520.

Köck R, Harlizius J, Bressan N, Laerberg R, Wieler LH, Witte W, Deurenberg RH, Voss A, Becker K, Friedrich AW. Prevalence and molecular characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) among pigs on German farms and import of livestock-related MRSA into hospitals. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2009; 28: 1375-1382.

Kondo Y, Ito T, Ma XX, Watanabe S, Kreiswirth BN, Etienne J, Hiramatsu K. Combination of Multiplex PCRs for Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* Type Assignment: Rapid Identification System for *mec*, *ccr*, and Major Differences in Junkyard Regions. Antimicrob Agents Chemother 2007; 51(1): 264-274.

Koreen L, Ramaswamy SV, Graviss EA, Naidich S, Musser JM, Kreiswirth BN. *spa* typing method for discriminating among *Staphylococcus aureus* isolates: implications for use of a single marker to detect genetic micro- and macrovariation. J Clin Microbiol. 2004; 42:792-799.

Kozitskaya S, Cho SH, Dietrich K, Marre R, Naber K, Ziebuhr W. The bacterial insertion sequence element IS256 occurs preferentially in nosocomial *Staphylococcus epidermidis* isolates: Association with biofilm formation and resistance to Aminoglycosides. Infect Immun 2004; 72: 1210-1215.

Kresken M, Hafner D, Schmitz FJ, Wichelhaus TA. Prevalence of mupirocin resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*: results of the Antimicrobial Resistance Surveillance Study of the Paul-Ehrlich-Society for Chemotherapy. Int J Antimicrob Agents 2004; 23: 577-581.

Krogh HF, Kristensen S. A study of skin diseases in dogs and cats. Nord Vet Med 1976; 28: 459-463.

Kroker R, Scherkl R, Ungemach FR. Chemotherapie bakterieller Infektionen. In: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin, 2nd edn. Frey HH, Löscher W, editors. Stuttgart: Enke Verlag; 2002: 353-393.

- Lannergård J, Norström T, Hughes D. Genetic determinants of resistance to fusidic acid among clinical bacteremia isolates of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 2059-2065.
- Leclercq R, Brisson-Noel A, Duval J, Courvalin P. Phenotypic Expression and Genetic Heterogeneity of Lincosamide Inactivation in *Staphylococcus* spp. *Antimicrob Agents Chemother* 1987; 31: 1887-1891.
- Leelaporn A, Paulsen IT, Tennent JM, Littlejohn TG, Skurray RA. Multidrug resistance to antiseptics and disinfectants in coagulase-negative staphylococci. *J Med Microbiol* 1994; 40: 214-220.
- Li XZ, Nikaido H. Efflux-mediated drug resistance in bacteria. *Drugs* 2004; 64: 159-204.
- Lilenbaum W, Veras M, Blum E, Souza GN. Antimicrobial susceptibility of staphylococci isolated from otitis externa in dogs. *Lett Appl Microbiol* 2000; 31: 42-45.
- Lina G, Quaglia A, Reverdy ME, Leclercq R, Vandenesch F, Etienne J. Distribution of genes encoding resistance to Macrolids, Lincosamides, and Streptogramins among staphylococci. *J Antimicrob Chemother* 1999; 43: 1062-1066.
- Lloyd DH, Garthwaite G. Epidermal structure and surface topography of canine skin. *Res Vet Sci* 1982; 33: 99-104.
- Lloyd DH. Dealing with cutaneous staphylococcal infection in dogs. *In Practice* 1996; 18: 223-231.
- Lloyd DH. Reservoirs of antimicrobial resistance in pet animals. *Clin Infect Dis*. 2007; 45: 148-152.
- Loeffler A, Linek M, Moodley A, Guardabassi L, Sung JM, Winkler M, Weiss R, Lloyd DH. First report of multiresistant, *mecA*-positive *Staphylococcus intermedius* in Europe: 12 cases from a veterinary dermatology referral clinic in Germany. *Vet Dermatol* 2007; 18: 412-21.

Loeffler A, Baines SJ, Toleman MS, Felmingham D, Milsom SK, Edwards EA, Lloyd DH. In vitro activity of fusidic acid and mupirocin against coagulase-positive staphylococci from pets. *J Antimicrob Chemother* 2008; 62: 1301–1304.

Lowy FD. Antimicrobial resistance: The example of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Invest* 2003; 111: 1265–1273.

Mack D, Rohde H, Harris LG, Davies AP, Horstkotte MA, Knobloch JK. Biofilm formation in medical device-related infection. *Int. J. Artif. Organs* 2006; 29: 343–359.

Malik S, Coombs GW, O'Brien FG, Peng H, Barton MD. Molecular typing of methicillin-resistant staphylococci isolated from cats and dogs. *J Antimicrob Chemother* 2006; 58: 428–431.

Malik S, Christensen H, Peng H, Barton MD. Presence and diversity of the  $\beta$ -lactamase gene in cat and dog staphylococci. *Vet Microbiol* 2007; 123: 162–168.

Mason IS, Lloyd DH. Scanning electron microscopical studies of the living epidermis and stratum corneum in dogs. In: *Advances in Veterinary Dermatology* Vol. 2. Ihrke PJ, Mason IS, editors. Oxford: Pergamon Press; 1993: 131–139.

Mason IS, Mason KV, Lloyd DH. A review of the biology of canine skin with respect to the commensals *Staphylococcus intermedius*, *Demodex canis* and *Malassezia pachydermatis*. *Vet Dermatol* 1996; 7: 119–132.

McEwan NA, Kalna D. A comparison of adherence by four strains of *Staphylococcus intermedius* and *Staphylococcus hominis* to canine corneocytes collected from normal dogs and dogs suffering from atopic dermatitis. *Res Vet Sci* 2005; 78: 193–198.

McKenzie T, Hoshino T, Tanaka T, Sueoka N. The nucleotide sequence of pUB110: some salient features in relation to replication and its regulation. *Plasmid* 1986; 15: 93–103.

Medleau L, Long RE, Brown J, Miller WH. Frequency and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus* species isolated from canine pyodermas. *Am J Vet Res* 1986; 47: 229–231.



Mendelsohn C, Rosenkrantz W, Griffin CE. Practical Cytology For Inflammatory Skin Diseases. Clin Tech Small Anim Pract 2006; 21:117-127

Miethke T, Duschek K, Wahl C, Heeg K, Wagner H. Pathogenesis of toxic shock syndrome: T cell mediated lethal shock caused by the superantigen TSST-1. Eur J Immunol 1993; 23: 1494-1500.

Monecke S, Ehricht R. Rapid genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolates using miniaturised oligonucleotide arrays. Clin Microbiol Infect 2005; 11: 825–833.

Monecke S, Jatzwauk L, Weber S, Slickers P, Ehricht R. DNA microarray-based genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from Eastern Saxony. CMI 2008; 14: 534–545.

Monecke S, Ehricht R, Slickers P, Tan HL, Coombs G. The molecular epidemiology and evolution of the Pantone–Valentine leukocidin-positive, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain USA300 in Western Australia. Clin Microbiol Infect 2009; 15: 770-776.

Moodley A, Stegger M, Zakour NL, Fitzgerald JR, Guardabassi L. Tandem repeat sequence analysis of staphylococcal protein A (*spa*) gene in methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. Vet Microbiol 2009; 135: 320-326.

Morris DO, Rook KA, Shofer FS, Rankin SC. Screening of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius* and *Staphylococcus schleiferi* isolates obtained from small companion animals for antimicrobial resistance: a retrospective review of 749 isolates (2003-04). Vet Dermatol 2006; 17: 332-337.

Morris DO, Boston RC, O'Shea K, Rankin SC. The prevalence of carriage of methicillin-resistant staphylococci by veterinary dermatology practice staff and their respective pets. Vet Dermatol 2010 DOI: 10.1111/j.1365-3164.2010.00866.x

Mueller RS, Stephan B. Pradofloxacin in the treatment of canine deep pyoderma: a multicentred, blinded, randomized parallel trial. Vet Dermatol 2007; 18: 144-151.

Mueller RS. Topical dermatological therapy. In: Small animal clinical pharmacology, 2nd edn. Maddison JE, Page SW, Church DB, editors. New York: Elsevier Health Sciences; 2008: 546-56.

Murchan S, Kaufmann ME, Deplano A, de Ryck R, Struelens M, Elsberg Zinn C, Fussing V, Salmenlinna S, Vuopio-Varkila J, El Solh N, Cuny C, Witte W, Tassios PT, Legakis N, van Leeuwen W, van Belkum A, Vindel A, Laconcha I, Garaizar J, Haeggman S, Olsson-Liljequist b, Ransjö U, Coombes G, Cookson B. Harmonization of Pulsed-Field Gel Electrophoresis Protocols for Epidemiological Typing of Strains of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: a Single Approach Developed by Consensus in 10 European Laboratories and Its Application for Tracing the Spread of Related Strains. J Clin Microbiol 2003; 41: 1574–1585.

Murphy C, Reid-Smith RJ, Prescott JF, Bonnett BN, Poppe C, Boerlin P, Weese JS, Janecko N, McEwen SA. Occurrence of antimicrobial resistant bacteria in healthy dogs and cats presented to private veterinary hospitals in southern Ontario: A preliminary study. Can Vet J 2009; 50: 1047-1053.

Murray IA, Shaw WV. O-Acetyltransferases for chloramphenicol and other natural products. Antimicrob Agents Chemother 1997; 41: 1-6.

Nemati M, Hermans K, Vancraeynest D, De Vlieghe S, Sampimon OC, Baele M, De Graef EM, Pasmans F, Haesebrouck F. Screening of bovine coagulase-negative staphylococci from milk for superantigen-encoding genes. Vet Rec 2008; 163: 740-743.

Nienhoff U, Kadlec K, Chaberny IF, Verspohl J, Gerlach GF, Schwarz S, Simon D, Nolte I. Transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains between humans and dogs: two case reports. J Antimicrob Chemother 2009; 64: 660-662.

Nilsson IM, Lee JC, Bremell T, Rydén C, Tarkowski A. The Role of Staphylococcal Polysaccharide Microcapsule Expression in Septicemia and Septic Arthritis. Infect Immun 1997; 65: 4216-4221.

Ng EY, Trucksis M, Hooper DC. Quinolone resistance mediated by *norA*: physiologic characterization and relationship to *flqB*, a quinolone resistance locus on the *Staphylococcus aureus* chromosome. Antimicrob Agents Chemother 1994; 38: 1345-1355.

- Noble WC, Rahman M, Karadec T, Schwarz S. Gentamicin resistance gene transfer from *Enterococcus faecalis* und *E. faecium* to *Staphylococcus aureus*, *S. intermedius* and *S. hyicus*. Vet Microbiol 1996; 52: 143-152.
- Noguchi N, Hase M, Kitta M, Sasatsu M, Deguchi K, Kono M. Antiseptic susceptibility and distribution of antiseptic-resistance genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. FEMS Microbiol Lett 1999; 172: 247–253.
- Noli C, Boothe D. Macrolides and Lincosamides. Vet Dermatol 1999; 10: 217-223.
- Noli C, Scarampella F. Praktische Dermatologie bei Hund und Katze. Hannover: Schlütersche Verlagsgesellschaft mbH & Co.KG. 2005: 3-12.
- Norström M, Sunde M, Tharaldsen H, Mørk T, Bergsjø B, Kruse H. Antimicrobial resistance in *Staphylococcus pseudintermedius* in the Norwegian dog population. Microb Drug Resist 2009;15: 55–59.
- O'Brien L, Kerrigan SW, Kaw G, Hogan M, Penadés J, Litt D, Fitzgerald DJ, Foster TJ, Cox, D. Multiple mechanisms for the activation of human platelet aggregation by *Staphylococcus aureus*: roles for the clumping factors ClfA and ClfB, the serine-aspartat repeat protein SdrE and protein A. Mol Microbiol 2002; 44: 1033-1044.
- Ofek I, Hasty DL, Sharon N. Anti-adhesion therapy of bacterial diseases: prospects and problems. FEMS Immunology and Medical Microbiology 2003; 38: 181-191.
- O'Neill AJ, McLaws F, Kahlmeter G, Henriksen AS, Chopra I. Genetic basis of resistance to fusidic acid in staphylococci. Antimicrob Agents Chemother 2007; 51: 1737-1740.
- Oliveira DC, Tomasz A, de Lencastre H. The evolution of pandemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: indentification of two ancestral genetic backgrounds and the associated *mec* elements. Microb Drug Resist. 2001; 7: 349-361.

Oliveira DC, de Lencastre H. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the *mec* element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 2155-2161.

Otto M. Staphylococcal biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol* 2008; 322: 207-228.

Patel JB. 16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory. *Mol Diagn* 2001; 6: 313-321.

Paul NC , Moodley A, Ghibaud G, Guardabassi L. Carriage of Methicillin-Resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in Small Animal Veterinarians: Indirect Evidence of Zoonotic Transmission. *Zoonoses Public Health* 2001; DOI: 10.1111/j.1863-2378.2011.01398.x.

Penna B, Varges R, Martins R, Martins G, Lilenbaum W. In vitro antimicrobial resistance of staphylococci isolated from canine urinary tract infection. *Can Vet J* 2010; 51: 738-742.

Penna B, Varges R, Medeiros L, Martins GM, Martins RR, Lilenbaum W. Species distribution and antimicrobial susceptibility of staphylococci isolated from canine otitis externa. *Vet Dermatol*. 2010a; 21: 292-296.

Perreten V, Kadlec K, Schwarz S, Grönlund Andersson U, Finn M, Greko C, Moodley A, Kania S., Frank LA, Bemis DA, Franco A, Iurescia M, Battisti A, Duim B, Wagenaar JA, van Duijkeren E, Weese JS, Fitzgerald JR, Rossano A, Guardabassi L. Clonal spread of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in Europe and North America: an international multicentre study. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65(6): 1145-1154.

Pérez-Vázquez M, Vindel A, Marcos C, Oteo J, Cuevas O, Trincado P, Bautista V, Grundmann H, Campos J. Spread of invasive Spanish *Staphylococcus aureus* *spa*-type t067 associated with a high prevalence of the aminoglycoside-modifying enzyme gene *ant(40)-Ia* and the efflux pump genes *msrA/msrB*. *J Antimicrob Chemother* 2009; 63: 21–31.

Pfaller MA, Herwaldt, LA. Laboratory, Clinical, and Epidemiological Aspects of Coagulase-Negative Staphylococci. Clin Microbiol Rev 1988; 1: 281-299.

Piddock LJV. Mechanisms of Fluoroquinolone Resistance: An Update 1994-1998. Drugs 1999; 58: 11-18.

Plough HH. Penicillin resistance of *Staphylococcus aureus* and its clinical implications. Am J Clin Pathol 1945; 15: 446-451.

Pottumarthy S, Schapiro JM, Prentice JL, Houze YB, Swanzy SR, Fang FC, Cookson BT. Clinical Isolates of *Staphylococcus intermedius* masquerading as methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 2004; 42: 5881-5884.

Roberts MC. Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. FEMS Microbiol Rev 1996; 19: 1-24.

Rodríguez-Aranda A, Daskalaki M, Villar J, Sanz F, Otero JR, Chaves F. Nosocomial spread of linezolid-resistant *Staphylococcus haemolyticus* infections in an intensive care unit. Diagn Microbiol Infect Dis 2009; 63: 398-402.

Rosec JP, Guiraud JP, Dalet C, Richard N. Enterotoxin production by staphylococci isolated from foods in France. Int J Food Microbiol 1997; 35: 213-221.

Rosenbach FJ. Mikro-Organismen bei den Wund-Infektions-Krankheiten des Menschen. J. F. Bergmann. Wiesbaden, Germany. 1884; 1-122.

Rosser EJ. German Shepherd Dog Pyoderma. Vet Clin Small Anim 2006; 36: 203-211.

Rubin JE, Ball KR, Chirino-Trejo M. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from various animals. Can Vet J. 2011; 52: 153-157.

Ruppé E, Barbier F, Mesli Y, Maiga A, Cojocar R, Benkhalfat M, Benchouk S, Hassaine H, Maiga I, Diallo A, Koumaré AK, Ouattara K, Soumaré S, Dufourcq JB, Nareth C, Sarthou JL, Andreumont A, Ruimy R. Diversity of staphylococcal cassette chromosome *mec* structures in methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus haemolyticus* strains among outpatients from four countries. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53(2): 442-449.

Ruscher C, Lübke-Becker A, Wleklinski CG, Soba A, Wieler LH, Walther B. Prevalence of Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from clinical samples of companion animals and equidae. *Vet Microbiol* 2009; 136: 197-201.

Saida N, Marzouk M, Ferjeni A, Boukadida J. A three-year surveillance of nosocomial infections by methicillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus* in newborns reveals the disinfectant as a possible reservoir. *Pathol Biol (Paris)* 2009; 57: 29-35.

Saidijam M, Benedetti G, Ren Q, Xu Z, Hoyle CJ, Palmer SL, Ward A, Bettenay KE, Szakonyi G, Meuller J, Morrison S, Pos MK, Butaye P, Walravens K, Langton K, Herbert RB, Skurray RA, Paulsen IT, O'reilly J, Rutherford NG, Brown MH, Bill RM, Henderson PJ. Microbial drug efflux proteins of the major facilitator superfamily. *Curr Drug Targets* 2006; 7: 793-811.

Saijonmaa-Koulumies LE, Lloyd DH. Colonization of the canine skin with bacteria. *Vet Dermatol* 1996; 7: 153-162.

Saini V, Olde Riekerink RGM, McClure JT, Barkema HW. Diagnostic Accuracy Assessment of Sensititre and Agar Disk Diffusion for Determining Antimicrobial Resistance Profiles of Bovine Clinical Mastitis Pathogens. *J Clin Microbiol* 2011; 49: 1568-1577.

Sanchez JA, Pierce KE, Rice JE, Wangh LJ. Linear-after-the-exponential (LATE)-PCR: an advanced method of asymmetric PCR and its uses in quantitative real-time analysis. *Proc Natl Acad Sci* 2004; 101: 1933-1938.

Sasaki T, Kikuchi K, Tanaka T, Takahashi N, Kamata S, Hiramatsu K. Reclassification of phenotypically identified *Staphylococcus intermedius* strains. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 2770-2778.

Schwarz R, Le Roux JM, Schaller R, Neurand K. Micromorphology of the skin (epidermis, dermis, subcutis) of the dog. Onderstepoort J Vet Res 1979; 46: 105-109.

Schwarz S, Noble WC. Tetracycline resistance genes in staphylococci from the skin of pigs. J Appl Bacteriol 1994; 76: 320-326.

Schwarz S, Roberts MC, Werckenthin C, Pang Y, Lange C. Tetracycline resistance in *Staphylococcus* spp. from domestic animals. Vet Microbiol 1998; 63: 217-227.

Schwarz S, Kehrenberg C, Doublet B, Cloeckaert A. Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. FEMS Microbiol Rev 2004; 28: 519-542.

Schwarz S, Alesík E, Werckenthin C, Grobbel M, Lübke-Becker A, Wieler LH, Wallmann J. Antimicrobial susceptibility of coagulase-positive and coagulase-variable *Staphylococci* from various indications of swine, dogs and cats as determined in the BfT-GermVet monitoring program 2004-2006. Berl Munch Tierarztl Wochenschr 2007; 120: 372-379.

Schwarz S, Kadlec K, Strommenger B. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* detected in the BfT-GermVet monitoring programme 2004-2006 in Germany. J Antimicrob Chemother 2008; 61: 282-285.

Schwarz S, Silley P, Simjee S, Woodford N, van Duijkeren E, Johnson AP, Gaastra W. Editorial: assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals. J Antimicrob Chemother. 2010; 65: 601-604.

Scicluna MT, Caprioli A, Saralli G, Manna G, Barone A, Cersini A, Cardeti G, Condoleo RU, Autorino GL. Characterisation of MRSA from Malta and the description of a Maltese epidemic MRSA strain. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2010; 29: 163-170.

Scott DW, Muller GH, Miller WH, Griffin CE. Muller and Kirk's Small Animal Dermatology, 6th edition. Philadelphia: WB Saunders. 2001: 1-70.

Scott DW, Muller GH, Miller WH, Griffin CE. Muller and Kirk's Small Animal Dermatology, 6th edition. Philadelphia: WB Saunders. 2001: 274-335.

Selbitz HJ, Truyen U, Weigand PV. Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. Stuttgart: Enke Verlag. 2011: 256-261.

Serra M, Brazis P, Puigdemont, A, Fondevila D, Romano V, Torre C, Ferrer L. Development and characterization of a canine skin equivalent. Exp Dermatol 2007; 16: 135-142.

Sidhu MS, Heir E, Leegaard T, Wiger K, Holck A. Frequency of disinfectant resistance genes and genetic linkage with beta-lactamase transposon Tn552 among clinical staphylococci. Antimicrob Agents Chemother. 2002; 46: 2797-2803.

Sidhu MS, Oppegaard H, Devor TF, Sørnum H. Persistence of multidrug-resistant *Staphylococcus haemolyticus* in an animal veterinary teaching hospital clinic. Microb Drug Resist 2007; 13: 271-280.

Sieradzki K, Villari P, Tomasz A. Decreased susceptibilities to teicoplanin and vancomycin among coagulase-negative methicillin-resistant clinical isolates of staphylococci. Antimicrob Agents Chemother. 1998; 42: 100-107.

Simou C, Thoday KL, Forsythe PJ, Hill PB. Adherence of *Staphylococcus intermedius* to corneocytes of healthy and atopic dogs: effect of pyoderma, pruritus score, treatment and gender. Vet Dermatol 2005; 16: 385-391.

Simou C, Hill PB, Forsythe PJ, Thoday KL. Species specificity in the adherence of staphylococci to canine and human corneocytes: a preliminary study. Vet Dermatol 2005a; 16: 156-161.

Shaw WV. Chloramphenicol acetyltransferase: Enzymology and molecular biology. CRC Crit Rev Biochem 1983; 14: 1-46.

Shittu A, Lin J, Morrison D, Kolawole D. Isolation and molecular characterization of multiresistant *Staphylococcus sciuri* and *Staphylococcus haemolyticus* associated with skin and soft-tissue infections. J Med Microbiol 2004 53: 51-55.



Slettemeås JS, Mikalsen J, Sunde M. Further diversity of the *Staphylococcus intermedius* group and heterogeneity in the *MboI* restriction site used for *Staphylococcus pseudintermedius* species identification. J Vet Diagn Invest 2010; 22: 756--759.

Soedarmanto I, Kanbar T, Ulbegi-Mohyla H, Hijan M, Alber J, Lämmle C, Akineden O, Weiss R, Moritz A, Zschöck M. Genetic relatedness of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP) isolated from a dog and the owner. Res Vet Sci 2011; 23 (Epub ahead of print).

Somerville-Millar D, Noble W. Resident and transient bacteria of the skin. J Cutan Pathol 1974; 1: 260-264.

Sperling LC. Hair anatomy for the clinician. J Am Acad Dermatol. 1991; 25: 1-17.

Stegmann R, Burnens A, Maranta CA, Perreten V. Human infection associated with methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* ST 71. J Antimicrob Chemother 2010 65: 2047-2048.

Stewart LJ. The role of pyoderma in pruritus. Vet Clin North Am Small Anim Pract 1988; 18: 1013-1022.

Stock I. Koagulase negative Staphylokokken als multiresistente Krankheitserreger. AMT 2007; 12: 1-4.

Strange P, Skov L, Lisby S, Nielsen PL, Baadsgaard O. Staphylococcal enterotoxin B applied on intact normal and intact atopical skin induces dermatitis. Arch Dermatol 1996; 132: 23-33.

Strommenger B, Kehrenberg C, Kettlitz C, Cuny C, Verspohl J, Witte W, Schwarz S. Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from pet animals and their relationship to human isolates. J Antimicrob Chemother 2006; 57: 461-465.

Strommenger B, Kettlitz C, Weniger T, Harmsen D, Friedrich AW, Witte W. Assignment of *Staphylococcus* isolates to groups by *spa*-typing, *SmaI* macrorestriction analysis, and multilocus sequence typing. J Clin Microbiol 2006a; 44: 2533-2540.

Strommenger B, Braulke C, Heuck D, Schmidt C, Pasemann B, Nübel U, Witte W. *spa* Typing of *Staphylococcus aureus* as a frontline tool in epidemiological typing. J Clin Microbiol 2008; 46: 574-581.

Sutherland R, Rolinson GN. Characteristics of methicillin-resistant Staphylococci. J Bacteriol 1964; 87: 887-99.

Sutherland R, Boon RJ, Griffin KE, Masters PJ, Slocombe B, White AR. Antibacterial activity of mupirocin (pseudomonic acid), a new antibiotic for topical use. Antimicrob Agents Chemother 1985; 27: 495-498.

Thaker NG, Spanogiannopoulos P, Wright GD. The tetracycline resistome. Cell Mol Life Sci 2010; 67: 419-431.

Trindade PA, McCulloch JA, Oliveira GA, Mamizuka EM. Molecular Techniques for MRSA Typing: Current Issues and Perspectives. Braz J Infect Dis 2003; 7: 32-43.

Tristan A, Ferry T, Durand G, Dauwalder O, Bes M, Lina G, Vandenesch F, Etienne J. Virulence determinants in community and hospital methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Hosp Infect 2007; 65: 105-109.

Tsubakishita S, Kuwahara-Arai K, Sasaki T, Hiramatsu K. Origin and Molecular Evolution of the Determinant of Methicillin Resistance in Staphylococci. Antimicrob Agents Chemother 2010; 54: 4352-4359.

Uhlen M, Guss B, Nilsson B, Gatenbeck T, Philipson L, Lindberg M. Complete sequence of the staphylococcal gene encoding protein A. A gene evolved through multiple duplications. J Biol Chem 1984; 259: 1695-1702.

Van Duijkeren E, Houwers DJ, Schoormans A, Broekhuizen-Stins MJ, Ikawaty R, Fluit AC, Wagenaar JA. Transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus intermedius* between humans and animals. Vet Microbiol 2008; 128: 213-215.

Van Hoovels LA, Vankeerberghen A, Boel K, Van Vaerenbergh, De Beenhouwer H. First case of *Staphylococcus pseudintermedius* infection in a human. J. Clin. Microbiol 2006; 44: 4609-4612.

Vanni M, Tognetti R, Pretti C, Crema F, Soldani G, Meucci V, Intorre L. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus intermedius* and *Staphylococcus schleiferi* isolated from dogs. Res Vet Sci 2009; 87: 192-195.

Vincze S, Paasch A, Walther B, Ruscher C, Lübke-Becker A, Wieler LH, Kohn B. Multidrug- and methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* as a cause of canine pyoderma: a case report. Berl Münch Tierärztl Wochenschr 2010; 123: 353-358.

Voladri RK, Kernodle DS. Characterization of a chromosomal gene encoding type B beta-lactamase in phage group II isolates of *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 1998; 42: 3163–3168.

Walker RC. The fluoroquinolones. Mayo Clin Proc 1999; 74: 1030-1037.

Walther B, Friedrich AW, Brunnberg L, Wieler LH, Lübke-Becker A. Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) in der Veterinärmedizin: ein "New Emerging Pathogen"? Berl Münch Tierärztl Wochenschr 2006; 119: 222-232.

Weese JS, Dick H, Willey BM, McGeer A, Kreiswirth BN, Innis B, Low DE. Suspected transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* between domestic pets and humans in veterinary clinics and in the household. Vet Microbiol 2006; 115: 148-155.

Werckenthin C, Cardoso M, Martel JL, Schwarz S. Antimicrobial resistance in staphylococci from animals with particular reference to bovine *Staphylococcus aureus*, porcine *Staphylococcus hyicus*, and canine *Staphylococcus intermedius*. Vet Res 2001; 32: 341–362.

Wertheim HF, Melles DC, Vos MC, van Leeuwen W, van Belkum A, Verbrugh HA, Nouwen JL. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. Lancet Infect Dis. 2005; 5: 751-762.

Witte W, Strommenger B, Stanek C, Cuny C. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in humans and animals, central europe. Emerg Infect Dis 2007; 13: 255-258.

Woodford N. Biological counterstrike: antibiotic resistance mechanisms of Gram-positive cocci. Clin Microbiol Infect 2005; 11: 2–21.

Woods GL, Washington JA. Antibacterial susceptibility tests: dilution and disk diffusion methods. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH (eds), *Manual of Clinical Microbiology*. American Society of Microbiology, Washington, DC. 1995; 1327–1341.

Wu SW, de Lencastre H, Tomasz A. Recruitment of the *mecA* Gene Homologue of *Staphylococcus sciuri* into a Resistance Determinant and Expression of the Resistant Phenotype in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 2001; 183: 2417-2424.

Yamagishi J, Kojima T, Oyamada Y, Fujimoto K, Hattori H, Nakamura S, Inoue M. Alterations in the DNA topoisomerase IV *grlA* gene responsible for quinolone resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 1157–1163.

Yoon JW, Lee GJ, Lee SY, Park C, Yoo JH, Park HM. Prevalence of genes for enterotoxins, toxic shock syndrome toxin 1 and exfoliative toxin among clinical isolates of *Staphylococcus pseudintermedius* from canine origin. *Vet Dermatol* 2010; 21: 484-489.

Yoon JW, Lee KJ, Lee SY, Chae MJ, Park JK, Yoo JH, Park HM. Antibiotic resistance profiles of *Staphylococcus pseudintermedius* isolates from canine patients in Korea. *J Microbiol Biotechnol* 2010a; 20: 1764-1768.

Zell C, Resch M, Rosenstein R, Albrecht T, Hertel C, Götz F. Characterisation of toxin production of coagulase-negative staphylococci isolated from food and starter cultures. *Int J Food Microbiol* 2008; 127: 246-251.

Ziebuhr W, Hennig S, Eckart M, Kränzler H, Batzilla C, Kozitskaya S. Nosocomial infections by *Staphylococcus epidermidis*: how a commensal bacterium turns into a pathogen. *Int J Antimicrob Agents* 2006; 28: 14-20.

Zhang W, Hao Z, Wang Y, Cao X, Logue CM, Wang B, Yang J, Shen J, Wu C. Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from pet animals and veterinary staff in China. *Vet J* 2011; doi:10.1016/j.tvjl.2011.02.006.

Zhu LX, Zhang W, Wang C, Yang HW, Jiang D, Zhang Q, Mitchelson K, Cheng J. Use of a DNA microarray for simultaneous detection of antibiotic resistance genes among Staphylococcal clinical isolates. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 3514–3521.

## IX. ANHANG

### 1. Medien, Lösungen und Puffer

Die verwendeten Chemikalien, Enzyme und Kits sind mit (\*) gekennzeichnet und werden im Anhang unter IX.2. mit den Bezugquellen aufgeführt.

- Äquilibrationpuffer

NEB-Puffer 4	25 µl
Aqua bidest.	225 µl

- Anreicherungskultur

Tryptone T*	10 g/l
NaCl	75 g/l
Mannitol*	10 g/l
Hefeextrakt*	2,5 g/l

Das Medium autoklavieren und anschließend bei 4 °C aufbewahren.

- Blutagarplatten (BAP)

Blut-Agar-Basis Nr. 2*	20,00 g
Aqua bidest.	500 ml

Das Medium autoklavieren und auf 52 °C abkühlen lassen. Defibriniertes Schafblut (25 ml) hinzufügen und gut mischen. Die Platten bei 4 °C aufbewahren.

- Brain-Heart-Infusion (BHI)-Medium

Hirn-Herz-Glukose-Bouillon*	3,70 g
Aqua bidest.	100 ml

Das Medium autoklavieren und bei 4 °C aufbewahren.

- Colistin-Nalidixinsäure-Agar

BBL Columbia CNA-Agar*	42,5 g
Aqua bidest.	1000 ml

Das Medium autoklavieren. Die Platten mit einer Schichtdicke von 4 mm gießen und bei 4 °C aufbewahren.

- Di-Natrium-EDTA 0,5 M  
Na<sub>2</sub>-EDTA\* 186,12 g  
Aqua bidest. ad 1000 ml  
Löst sich, wenn pH 8 mit NaOH\* eingestellt ist
- DNeasy Blood & Tissue Kit\*  
Collection Tubes (2 ml)  
Buffer AW1  
Buffer AW2  
Proteinase K
- ESP-Lösung  
Na<sub>2</sub>-EDTA 0,5 M  
Auf pH 9 mit NaOH einstellen  
Sarkosyl (N-Lauroylsarkosine)\* 1 %  
Erst kurz vor Gebrauch hinzufügen:  
Proteinase K\* 0,65 mg/ml
- Gassner-Agar  
Gassner-Agar 77 g  
Aqua bidest 1.000 ml  
Das Medium autoklavieren. Die Platten mit einer Schichtdicke von 4 mm gießen und bei 4 °C aufbewahren.
- GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit\*  
Capture buffer type 3  
Collection tubes  
Elution buffer type 6  
MicroSpin Columns  
Wash buffer type 1

- Lyselösung

NaCl	1 M
Tris pH 8	10 mM
Na <sub>2</sub> -EDTA	200 mM
Na-Laurylsarkosine sodium salt*	0,5 %
Deoxycholic acid sodium salt*	0,2 %
Erst kurz vor Gebrauch hinzufügen:	
RNase*	2 µg/ml
Lysozym*	1 mg/ml
Lysostaphin*	1800 U/ml

- Matrixlösung

Acetonitril*	250 µl
Aqua bidest.	237,5 µl
Trifluoressigsäure*	12,5 µl

- Mueller-Hinton-Agar

Mueller-Hinton-Agar	38 g
Aqua bidest.	1000 ml

Das Medium autoklavieren. Die Platten mit einer Schichtdicke von 4 mm gießen und bei 4 °C aufbewahren.

- NaCl 5 M

NaCl*	292,2 g
Aqua bidest.	ad 1000 ml

- Pett IV-Puffer

NaCl	1 M
Tris pH8	10 mM
Na <sub>2</sub> -EDTA	10mM

- Physiologische Kochsalzlösung (0,85 %)

NaCl*	0,85 g
Aqua bidest.	100 ml

Die Lösung autoklavieren

- Rambach-Agar

Rambach-Agar\*

Pulver + Supplement in  
Fertigportionen

Aqua bidest.

1000 ml

Das Medium autoklavieren. Die Platten mit einer Schichtdicke von 4 mm gießen und bei 4 °C aufbewahren.

- StaphyType<sup>TM</sup> Kit\*

A1 Lysis Buffer

A2 Lysis Enhancer

B1 Labelling Buffer

B2 Labelling Enzyme

Array Strips

CapStrips

C1 Hybridisation Buffer

C2 Washing Buffer 1

C3 HRP Conjugate

C4 Conjugate Buffer

C5 Washing Buffer 2

Horseradish Peroxidase Substrate

- TE-PMSF-Lösung

Tris/HCl (Salzsäure) pH = 8

10 mM

Na<sub>2</sub>-EDTA

1 mM

Phenylmethylsulfonsäurefluorid

1,5 mM

(PMSF)

PMSF erst kurz vor Gebrauch hinzufügen.

- TE-Puffer (10:1)

Tris/HCl pH = 8

10 mM

Na<sub>2</sub>-EDTA

1 mM



- Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer (10x)

Tris*	0,4 M
-------	-------

Ethylen-diamin-tetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat (Na <sub>2</sub> EDTA)*	0,01 M
--	--------

Essigsäure*	11,4 ml/l
-------------	-----------

Den pH-Wert des Puffers auf pH = 7,8 einstellen. Die Lösung autoklavieren. Zum Gebrauch als Laufpuffer (1 x) 1:10 mit Aqua bidest. verdünnen.

- Tris-Borat-EDTA (TBE)-Puffer (10 x)

Tris	0,9 M
------	-------

Borsäure*	0,9 M
-----------	-------

EDTA (Na-frei)*	0,5 M
-----------------	-------

Die Lösung autoklavieren. Bis zur gewünschten Konzentration 1:10 oder 1:20 verdünnen.

- Tris-EDTA-Natriumchlorid (TES)-Puffer

NaCl	100 mM
------	--------

Tris/HCl pH=8	10 mM
---------------	-------

EDTA (Na-frei)*	0,5 M
-----------------	-------

- Tris-HCl 2M

Tris*	242,2 g
-------	---------

Aqua bidest.	ad 1000 ml
--------------	------------

Auf pH 8,0 mit HCl\* einstellen.

## 2. Chemikalien und Enzyme

### Chemikalien

Antibiotikahaltige Plättchen: AK, AMP, C, CL, CN, CVN, DO, E, ENR, F, IPM, SXT AUG, DA MAR	OXOID, Wesel  PFIZER, Berlin  VETOQUINOL, Ravensburg
Acetonitril	FLUKA ANALYTICAL, Taufkirchen
BBL Columbia CNA-Agar	BECTON DICKINSON, Heidelberg
Blaumarker Gel Loading Dye, Blue (6X)	NEW ENGLAND BIOLABS, Frankfurt a.M.
Blut-Agar-Basis-Nr. 2	OXOID, Wesel
Borsäure	ROTH, Karlsruhe
Chloroform	MERCK, Darmstadt
Chromosomal Grade Agarose	BIO-RAD, München
dATP, dCTP, dGTP, dTTP	FERMENTAS, St. Leon-Rot
DNA-Ladder 100 bp	BIOLABS, Frankfurt a.M.
DNeasy Blood & Tissue Kit	QIAGEN, Hilden
<i>E. coli</i> Standard	BRUKER DALTONICS, Bremen
EDTA (Na-frei)	SIGMA, Deisenhofen
Essigsäure	MERCK, Darmstadt
Ethanol 96 %	ROTH, Karlsruhe
Gassner Agar	MERCK, Darmstadt
GelRed <sup>TM</sup>	BIOTIUM, Hayward (USA)
GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit	GE HEALTHCARE, München
Glycerin	ROTH, Karlsruhe
HCl	MERCK, Darmstadt
Hefeextrakt	MERCK, Darmstadt
Hirn-Herz-Glukose-Bouillon	OXOID, Wesel
Isoamylalkohol	MERCK, Darmstadt
Isopropanol	ROTH, Karlsruhe
Lysostaphin	SIGMA, Deisenhofen
Lysozym	SIGMA, Deisenhofen
NaCl	ROTH, Karlsruhe
Natrium-dodecylsulfat (SDS)	ROTH, Karlsruhe
Natrium-deoxycholat	SIGMA, Deisenhofen
Na <sub>2</sub> -EDTA	MERCK, Darmstadt
NaOH	ROTH, Karlsruhe
N-Laurylsarcosine (Sarkosyl)	SIGMA, Deisenhofen
N-Laurylsarcosine sodium salt	SIGMA, Deisenhofen
Mannitol	MERCK, Darmstadt
Phenol/Chloroform (Roti®-Phenol/Chloroform)	ROTH, Karlsruhe
PMSF	SERVA, Heidelberg
Proteinase K	MERCK, Darmstadt

Rambach Agar	MERCK, Darmstadt
RNAse A	QIAGEN, Hilden
SeaKem® GTG Agarose	BIOZYM, Hess. Oldendorf
StaphyType™ Kit	CLONDIAG, Jena
Trifluoressigsäure	SIGMA, Deisenhofen
Tris	SIGMA, Deisenhofen
Tryptone T	OXOID, Wesel

### Enzyme

Lysostaphin	SIGMA, Deisenhofen
Proteinase K	MERCK, Darmstadt
<i>Taq</i> DNA Polymerase	FERMENTAS, St. Leon-Rot

**Tabelle IX-1: Enzyme**

Enzym	10 x-Puffer	Temperatur	Hersteller
<i>Mbo</i> I	Puffer R	37 °C	FERMENTAS, St. Leon-Rot
<i>Sma</i> I	NEBuffer 4	25 °C	NEW ENGLAND BIOLABS, Frankfurt a.M.

### 3. Geräte und sonstige Materialien

Arraymate Reader	CLONDIAG, Jena
Heraeus Brutschrank	THERMO FISHER, Langenselbold
C24 Incubator Shaker	NEW BRUNSWICK, Nürtingen
Centrifuge 5430	EPPENDORF, Hamburg
Densimat	BIOMÉRIEUX, Nürtingen
Eppendorf-tube 1,8 ml	EPPENDORF, Hamburg
Feinwaage	SARTORIUS, Göttingen
IKA® Vortex Genius 3	SIGMA, Deisenhofen
MALDI Biotyper Software 2.0	BRUKER DALTONICS, Bremen
MALDI-Target	BRUKER DALTONICS, Bremen
Microflex LT System	BRUKER DALTONICS, Bremen
Navigator™ Waage	OHAUS, Frankfurt a.M.
Phase Lock Reaktionsgefäße	5-PRIME, Hamburg
Sensititre Susceptibility Plates	TRECK DIAGNOSTIC SYSTEMS; West Sussex, England
Spectrophotometer Nanodrop ND-1000	PEQLAB, Erlangen
Stromgeber Power Supply 0-300 V.GC	BEHRINGWERKE AG, Marburg
Thermocycler vapo.protect Mastercycler pro	EPPENDORF, Hamburg
Thermomixer comfort	EPPENDORF, Hamburg
Uvikon <sub>XS</sub> Photometer	BIO-TEK, Bad Friedrichshall
Zentrifuge 5810R	EPPENDORF, Hamburg

## **4. Einverständniserklärung und Fragebögen**

### **4.1. Einverständniserklärung**

Hiermit bestätige ich die Teilnahme an der Studie „Lokalisation und Typisierung multiresistenter Staphylokokken bei Hunden und ihren Besitzern“. Dabei werden bei mir und bei meinem Hund Tupferproben zur Bestimmung von Hautbakterien genommen.

Meine persönlichen Daten werden nicht an Dritte weitergegeben. Über die Ergebnisse meiner Tupferproben und meines Tieres werde ich ausschließlich persönlich informiert.

---

Name

---

Unterschrift

---

Datum

**4.2. Besitzer-Fragebogen**

Name:

Tiername:

Datum:

Angaben zum Tierbesitzer:

Alter:

Geschlecht:

Bitte ankreuzen:

Bitte ankreuzen:	Ja	Nein
1. Sind Sie diejenige Person, welche am meisten Kontakt mit dem Tier hat?		
2. Wird Ihr Tier im Haus gehalten?		
3. Wird Ihr Tier im Zwinger gehalten?		
4. Schläft der Hund mit im Schlafzimmer?		
5. Liegt der Hund auf dem Bett oder auf dem Sofa?		
6. Leckt Ihr Hund Ihnen das Gesicht?		
7. Sind andere Personen im Haushalt vorhanden?		
7a. Wenn ja, wieviele und wie alt?	Alter:	
Person 1:		
Person 2:		
Person 3:		
Person 4:		
8. Arbeiten Sie oder jemand anderes aus Ihrem Haushalt im Gesundheitsbereich? (Krankenschwester, Arzt, Physiotherapeut usw.)		
8a. Wenn ja, welcher Job wird ausgeübt?		
9. Sind bei Ihnen Erkrankungen bekannt, die zu einer Immunschwäche führen?		
10. Waren Sie oder jemand anderes aus Ihrem Haushalt im letzten Jahr als Patient im Krankenhaus?		
11. Wurden Sie oder jemand anderes aus Ihrem Haushalt im letzten Jahr in der Notaufnahme behandelt?		
12. Hatten Sie oder jemand anderes aus Ihrem Haushalt im letzten Jahr eine Hautinfektion?		
12a. Wenn ja, wurde die Infektion mit Antibiotika behandelt?		
13. Haben Sie im letzten Jahr aus einem anderem Grund Antibiotika genommen?		
14. Wurde bei Ihnen bereits ein MRSA (methicillinresistenter <i>Staphylococcus aureus</i> ) diagnostiziert?		
14a. Wenn ja, wann? (Monat und Jahr)		
15. Sind andere Tiere im Haushalt vorhanden? (Vögel, Katzen, Pferde usw.)		
1) Tierart	Alter:	Rasse:
2) Tierart	Alter:	Rasse:
3) Tierart	Alter:	Rasse:
4) Tierart	Alter:	Rasse:

### 4.3. Tierprotokoll

Patientennummer:	
Tiername:	
Besitzer:	
Rasse:	
Alter:	
Kurze Beschreibung der Läsionen und deren Lokalisation:	
Zytologische Ergebnisse:	
Sonstige Erkrankungen des Tieres:	
Wenn ja, derzeitige Therapie der Erkrankung:	
Antibiotika-Therapie der letzten 3 Monate:	
Glucocorticoid-Therapie der letzten 3 Monate:	
Derzeitiger Medikamenteneinsatz:	
Ursache der Pyodermie:	
Lokalisation der läsionalen Tupferprobe:	

## 5. Phänotypische Empfindlichkeitsbestimmung

### 5.1. Tabelle IX-2 Phänotypische Empfindlichkeit der MRSP-Stämme

Proben Nr.	AUG	OX	CL	CPD	CVN	ENR	MAR	SXT	V	DA	E
115	16*	≥ 32	64	≥ 32	≥ 16	16	16	8/152	0,25	≥ 128	≥ 64
126	16	≥ 32	64	≥ 32	≥ 16	16	16	4/76	0,5	≥ 128	≥ 64
735	≥ 64	≥ 32	32	≥ 32	≥ 16	8	8	8/152	0,5	≥ 128	≥ 64
1850	16	≥ 32	64	≥ 32	≥ 16	16	16	8/152	1	≥ 128	≥ 64
3164	16	≥ 32	32	≥ 32	≥ 16	≥ 32	16	4/76	1	≥ 128	≥ 64
3674	32	≥ 32	64	≥ 32	≥ 16	16	8	4/76	1	≥ 128	≥ 64
3734	8	≥ 32	32	≥ 32	≥ 16	≥ 32	16	4/76	1	≥ 128	≥ 64
4430	32	≥ 32	64	≥ 32	≥ 16	8	16	4/76	1	≥ 128	≥ 64
4489	32	≥ 32	32	≥ 32	≥ 16	8	8	4/76	0,5	≥ 128	≥ 64

\*Angaben in µg/ml



### 5.2. Tabelle IX-3: Phänotypische Empfindlichkeit der MRSH-Stämme

Proben Nr.	AUG	OX	CL	CPD	CVN	ENR	MAR	SXT	V	DA	E
<b>279</b>	8*	≥ 32	32	16	≥ 16	0,06	0,12	0,12/2,38	1	0,25	≥ 64
<b>818</b>	16	≥ 32	32	≥ 32	≥ 16	≥ 32	16	8/153	0,5	0,12	≥ 64
<b>4384</b>	16	≥ 32	32	≥ 32	≥ 16	≥ 32	≥ 32	32/608	2	0,25	≥ 64
<b>4669</b>	8	≥ 32	16	16	≥ 16	16	≥ 32	64/1216	1	1	≥ 64

\*Angaben in µg/ml

### 5.3. Tabelle IX-4: Phänotypische Empfindlichkeit der mRSP-Stämme

Proben Nr.	AUG	OX	CL	CPD	CVN	ENR	MAR	SXT	V	DA	E
<b>876</b>	0,12*	0,12	0,25	1	0,03	8	0,12	4/76	0,5	64	≥ 64
<b>1136</b>	0,12	0,12	0,12	0,12	0,06	16	16	0,5/9,5	0,5	64	≥ 64
<b>4184</b>	0,12	0,12	0,12	0,12	0,03	16	16	4/76	0,5	0,25	0,5

\*Angaben in µg/ml

**5.4. Tabelle IX-5: Phänotypische Empfindlichkeit der MRSA-Stämme**

<b>Nr.</b>	<b>AUG</b>	<b>OX</b>	<b>CL</b>	<b>CPD</b>	<b>CVN</b>	<b>ENR</b>	<b>MAR</b>	<b>SXT</b>	<b>V</b>	<b>DA</b>	<b>E</b>
<b>1015</b>	16*	≥ 16	64	≥ 32	≥ 16	≥ 32	≥ 32	8/152	0,5	0,06	0,5

\*Angaben in µg/ml

## 6. Tabellenverzeichnis

Tabelle II-1: Wichtige Pathogenitätsfaktoren der Staphylokokken	15
Tabelle II-2: Fragmentgrößen des <i>S.aureus</i> -Stammes 8325 nach <i>SmaI</i> -Verdau und Pulsfeld-Gelelektrophorese	24
Tabelle III-1: Referenzstämme	36
Tabelle III-2: Selektivmedien	37
Tabelle III-3: Primer	38
Tabelle III-4: Feldstämme	39
Tabelle III-5: Ausgewählte Staphylokokken-Stämme für die erstellten Referenzspektren	43
Tabelle III-6: Untersuchte Antibiotika im Agardiffusionsverfahren	44
Tabelle III-7: Verwendete Antibiotika bei der Empfindlichkeitsbestimmung durch Bouillon-Mikrodilution	45
Tabelle IV-1: Wachstum der <i>mecA</i> -positiven Staphylokokken Spezies auf MRSA Screening Agar	61
Tabelle IV-2: Wachstum von MRSP in Mischkulturen mit verschiedenen anderen Bakterien auf MRSA Screening Agars	62
Tabelle IV-3: Negative Probenergebnisse	65
Tabelle IV-4: Hunde mit multiresistenten Staphylokokken	66
Tabelle IV-5: Übersicht der isolierten Staphylokokken bei Hunden mit MRSP-Nachweis	68
Tabelle IV-6: Übersicht der isolierten Staphylokokken bei Hunden mit MRSH-Nachweis	70
Tabelle IV-7: Übersicht der isolierten Staphylokokken bei Hunden mit mRSP-Nachweis	72
Tabelle IV-8: Phänotypische Empfindlichkeit der MRSP-Stämme mittels Agardiffusionstest und Bouillon-Mikrodilution	75
Tabelle IV-9: Phänotypische Empfindlichkeit der MRSH-Stämme mittels Agardiffusionstest und Bouillon-Mikrodilution	75
Tabelle IV-10: Phänotypische Empfindlichkeit der mRSP-Stämme mittels Agardiffusionstest und Bouillon-Mikrodilution	76
Tabelle IV-11: Phänotypische Empfindlichkeit der MRSA-Stämme mittels Agardiffusionstest und Bouillon-Mikrodilution	76
Tabelle IV-12: Ergebnisse der <i>spa</i> -Typisierung der MRSP-Stämme	78
Tabelle IV-13: Resistenzgene der MRSP-Stämme	84
Tabelle IV-14: Resistenzgene der MRSH-Stämme	85
Tabelle IV-15: Resistenzgene der mRSP-Stämme	86
Tabelle IV-16: Darstellung der Microarray-basierten SCC <i>mec</i> -Typisierung von MRSA-Stämmen der Probe 1015	87
Tabelle IX-1: Enzyme	135
Tabelle IX-2: Phänotypische Empfindlichkeit der MRSP-Stämme	140
Tabelle IX-3: Phänotypische Empfindlichkeit der MRSH-Stämme	141
Tabelle IX-4: Phänotypische Empfindlichkeit der mRSP-Stämme	141
Tabelle IX-5: Phänotypische Empfindlichkeit der MRSA-Stämme	142

## 7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung II-1: Aufbau der Haut aus NOLI & SCARAMPELLA, 2005	4
Abbildung II-2: Schematische Darstellung einer SCC <i>mec</i> -Kassette vom Typ IV nach DEURENBERG & STOBBERINGH (2008).	29
Abbildung III-1: Geschnittene und ungeschnittene <i>pta</i> -Produkte der SIG	52
Abbildung III-2: Darstellung eines Array-Strips mit den darin enthaltenen DNA-Chips (Alere GmbH, Köln)	55
Abbildung III-3: DNA-Chip mit positiven und negativen Spots	57
Abbildung III-4: Ausschnitt eines Daten-Berichtes der <i>S. aureus</i> -Genotypisierung	58
Abbildung IV-1: Aus Moodley et al. (2009): DNA-Sequenzen mit sich daraus ergebenden Repeat-Sequenzen	77
Abbildung IV-2: Aus Moodley et al. (2009): Repeat-Sequenzen mit sich daraus ergebenden <i>spa</i> -Typen	78
Abbildung IV-3: Sequenz des <i>spa</i> -Typs 1214 der MRSA-Stämme von Proben Nr. 1015	79
Abbildung IV-4: Makrorestriktionsanalyse mit anschließender PFGE von MRSP-Stämmen der Probe 126	80
Abbildung IV-5: Makrorestriktionsanalyse mit anschließender PFGE der MRSP-Stämme von 4430 und 4489	80
Abbildung IV-6: Makrorestriktionsanalyse mit anschließender PFGE der MRSH-Stämme von Probe 4384	81

## **X. DANKSAGUNG**

Bei Herrn Prof. Ralf Müller möchte ich mich ganz herzlich für die Überlassung des anspruchsvollen und aktuellen Themas bedanken. Die Zusammenarbeit sowohl aus klinischer als auch aus wissenschaftlicher Sicht war mir ein Vergnügen.

Besonders möchte ich mich bei Frau Dr. Christiane Werckenthin bedanken, die mich mit großer Geduld in die Welt der Mikrobiologie einführte und mir bei der Durchführung der Dissertation mit ihrem Fachwissen und Engagement zur Seite stand. Bedanken möchte ich mich auch für die vielen schönen und lustigen privaten Stunden.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Reinhard Straubinger für die fachliche Unterstützung sowie die Bereitstellung des Arbeitsplatzes. Die konstruktiven und aufmunternden Gespräche waren mir eine große Hilfe.

Meinen Kollegen in der dermatologischen Abteilung möchte ich für ihre aktive Unterstützung bei der Probensammlung danken. Die zum Teil nervenaufreibende Zeit beim Pendeln zwischen Klinik und Labor wurde durch euch viel erträglicher.

Bedanken möchte ich mich auch bei den Mitarbeitern des mikrobiologischen Institutes für ihre tatkräftige Unterstützung bei der Erstellung der Doktorarbeit, insbesondere bei Mira Vodopija, ohne die ich noch heute Drei-Ösen-Ausstriche anfertigen würde.

Der Alere GmbH (Köln) danke ich für die Bereitstellung des Arraymate Reader und für die Hilfe bei der Datenanalyse.

Meine Eltern möchte ich für ihre Geduld und nicht nur finanzielle Unterstützung während des gesamten Studiums und während der Erstellung der Doktorarbeit danken.